

## ***Origanum vulgare* L. Uçucu Yağının Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Büyüme, Lizozim ve Antioksidan Aktivite ve *Vibrio anguillarum*' a Karşı Direnç Üzerine Etkisi\***

Öznur DİLER<sup>1</sup>, Öznur GÖRMEZ<sup>1\*\*</sup>, Seçil METİN<sup>1</sup>, İlter İLHAN<sup>2</sup>, İbrahim DİLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı, Isparta

Geliş : 10.10.2016

Kabul : 02.11.2016

**Araştırma Makalesi / Research Article**

\*\*Sorumlu Yazar: oznurgormez@sdu.edu.tr

E-Dergi ISSN: 1308 – 7517

### **Özet**

Bu çalışmanın amacı gökkuşluğu alabalığı yemine farklı oranlarda eklenen *Origanum vulgare* L. uçucu yağının büyüme performansı, lizozim ve antioksidan aktiviteleri ve hastalık direnci üzerine etkilerinin belirlenmesidir. Balıklar (26-27 g), dört farklı konsantrasyonda (0,125, 1,5, 2,5 ve 3,0 ml/kg) *O. vulgare* uçucu yağı ilave edilmiş yem ile 90 gün boyunca beslenmiştir. *O. vulgare* uçucu yağı içeren yemle beslenen gruplarda sadece 0,125 ml/kg konsantrasyonu hariç diğer gruplarda büyüme değerlerinde kontrol grubuna göre önemli bir artış belirlenmiştir (P<0,05). Balıklardaki yem dönüşüm ve yem değerlendirme oranları ise 1,5 ve 3,0 ml/kg oranında *O. vulgare* uçucu yağı içeren yemle beslenen gruplarda diğer gruplara göre artış göstermiştir (P<0,05). Balıkların antioksidan enzim aktiviteleri (plazma süperoksit dismutaz (SOD), plazma katalaz (CAT)) ve lizozim aktivitesi belirlenmiştir. Plazma süperoksit dismutaz (SOD) ve lizozim aktivitesi düzeyleri kontrol grubuna göre *O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen diğer gruplarda yüksek seviyede saptanmıştır. *in vivo* antibakteriyel aktivitenin tespiti amacıyla, balıklara *V. anguillarum* patojeni ile deneysel enfeksiyon uygulamaları yapılmış ve *O. vulgare* uçucu yağı içeren yemle beslenen tüm gruplarda ölüm oranında önemli derecede azalma tespit edilmiştir (P<0,05). Sonuç olarak, *O. vulgare* uçucu yağının balık yemine ilave edilmesi balıklarda büyümeyi destekleyici, lizozim ve antioksidan aktiviteyi artırıcı ve aynı zamanda patojenlere karşı direnci artırıcı bir etki göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Gökkuşluğu alabalığı, *Origanum vulgare* L., büyüme performansı, antioksidan aktivite, *Vibrio anguillarum*

### **Effect of *Origanum vulgare* L. Essential Oil on Growth, Lysozyme and Antioxidant Activity and Resistance Against *Vibrio anguillarum* in Rainbow Trout**

#### **Abstract**

The aim of this study were to investigate the effects of different levels of *Origanum vulgare* L. essential oil as feed additives on the growth performance, lysozyme and antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout. Fish (26-27 g) were fed the experimental diets supplemented with four different concentrations (0.125, 1.5, 2.5, 3.0 ml kg<sup>-1</sup>) of *O. vulgare* essential oil for 90 days. Fish fed diets containing essential oils of *O. vulgare* had significantly higher growth than the control group except 0.125 in *O. vulgare* (P<0.05). Feed conversion ratio in fish fed diets containing 1.5 and 3.0 ml kg<sup>-1</sup> essential oil of *O. vulgare* was improved than other treatments (P<0.05). Antioxidant enzyme activities (plasma superoxide dismutase (SOD), plasma catalase (CAT)) and lysozyme activity of fish was assayed. Results showed that the levels of plasma superoxide dismutase activity and lysozyme activity were higher in *O. vulgare* group compared to control. For *in vivo* antibacterial activity, fish were challenged with *V. anguillarum* and dietary administration essential oil of *O. vulgare* in all groups significantly reduced mortality (P<0.05). In conclusion, the essential oil of *O. vulgare* can be applied as growth promoter, increase antioxidant activity and also improve disease resistance to pathogens when added to rainbow trout feed.

*Keywords:* Rainbow trout, *Origanum vulgare* L., growth performance, antioxidant activity, *Vibrio anguillarum*

\*Bu çalışma 1120855 numaralı TÜBİTAK/1001 projesiyle desteklenmiştir.

## GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelerdeki en önemli problemlerin başında enfeksiyöz hastalıklar ve sağlık sorunlarına bağlı olarak yem değerlendirme oranının azalması gelmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Schnick vd., 1997). Bununla birlikte, günümüzde antibiyotiklerin direnç gelişimi, balık etinde kalıntı bırakması ve bunu tüketen insanlarda kanserojenik ve alerjik reaksiyonlara sebep olması nedeniyle kullanımında sınırlandırmalar getirilmiştir. Bu sınırlandırma ile birlikte gerek gastrointestinal mikrofloranın sağlığını koruyarak bakteriyel hastalıkların kontrol altına alınması, gerekse hayvanların bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve büyüme performansının desteklenmesi amacıyla bazı tıbbi bitki türleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Hermann vd., 2003).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde balık hastalıklarının kontrolünde özellikle bitkilerden elde edilen doğal maddelerin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır (Gatesoupe, 1999; Irianto ve Austin, 2002; Abdel-Tawwab vd., 2008; Aly vd., 2008;; Ard' o vd., 2008; Goda, 2008; Kesarcodi-Watson vd., 2008; Won vd., 2008; Immanuel vd., 2009; Abdel-Tawwab, 2010; Ahilan vd., 2010; Ndong ve Fall, 2011; Oskoi vd., 2012). Bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmek için uygulanan bu tedavilerden bir tanesi de bitkisel uçucu yağlardır. Bu bileşikler, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı su ürünlerinde alternatif profilaktik ve terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Turker ve Birinci Yıldırım, 2015). Bununla birlikte uçucu yağların su ürünleri alanında kullanımı ile ilgili yapılan araştırmalar çok sınırlıdır.

Kanal yayın balık (*Ictalurus punctatus*)' larında *Origanum heracleoticum* uçucu yağı, karvakrol ve timol bileşenlerinin etkisini araştırdıkları çalışmada, *O. heracleoticum* uçucu yağı ile beslenen balıklarda büyüme performansı ve antioksidan aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Deneysel yolla oluşturulan *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonlarına karşı da *O. heracleoticum* ile beslenen grupta en yüksek yaşama oranı elde edilmiştir (Zheng vd., 2009). Bir diğer çalışmada, gökkuşağı alabalıklarında *Origanum onites* uçucu yağı içeren yem ile yapılan beslemenin büyüme performansı üzerine olumlu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *O. onites* ile 8 haftalık besleme sonucu *Lactococcus garvieae* ile yapılan deneysel enfeksiyon sonucunda ölüm oranlarının azaldığı tespit edilmiştir (Diler vd., 2016).

Turi vd. (2009), 200 ppm konsantrasyonda biberiye (*Rosemarinus officinalis*) uçucu yağının levreklerde büyüme üzerine olumlu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Gökkuşağı alabalıklarında timol ve karvakrol ile yapılan besleme çalışmalarında ise büyüme performansının arttığı tespit edilmiştir (Ahmadifar vd., 2011; Giannenas vd., 2012). Karvakrol ile beslemenin tilapialarda *Edwardsiella tarda* ve levreklerde *V. anguillarum* enfeksiyonlarına karşı direnç sağladığı bildirilmiştir (Rattanachaikunsopond ve Phumklachor, 2010; Volpatti vd., 2013).

Bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarında farklı oranlarda yeme ilave edilen *Origanum vulgare* uçucu yağı ile beslemenin *V. anguillarum*' a karşı *in vivo* antibakteriyel etkisi, büyüme performansı, antioksidan enzim aktiviteleri ve lizozim aktivitesi ile dokulardaki histopatolojik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Balık ve Deneme Dizaynı

Çalışmada, ağırlıkları 26-27 g arasında değişen 1050 adet gökkuşağı alabalığı kullanılmıştır. Deneme balıkları Isparta' nın Aksu İlçesinde bulunan özel bir işletmeden temin edilmiştir. Besleme denemeleri Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesinde ve deneysel enfeksiyon uygulamaları Hastalık Ünitesinde 400 lt' lik fiberglas tanklarda gerçekleştirilmiştir.

5 farklı gruba (Kontrol, 0,125, 1,5, 2,5 ve 3,0 ml/kg) ayrılan balıklar deneme başlayıncaya kadar deneysel ortama alıştırmak için 2 hafta süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Bu süre boyunca balıklar ticari alabalık pelet yemiyle günde iki kez doyuncaya kadar beslenmiştir. Denemeye başlamadan önce rastgele seçilen 10 adet balık mikrobiyolojik yönden (bakteri, mantar, parazit) incelenmiş ve herhangi bir enfeksiyon taşımadığı görülmüştür. Adaptasyon süresinin sonunda boy ve ağırlıkları eşit olmak üzere tesadüfi olarak deneme tanklarının her birine 70 adet balık olacak şekilde eşit ağırlıkta dağıtılmıştır. Deneme üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve 90 gün süresince besleme devam etmiştir.

### Çalışmada Kullanılan Suyun Özellikleri

Artezyen suyu debisi 12 lt/dk, tanklardaki suyun ortalama sıcaklığı  $12 \pm 2$  °C, pH' sı 7,3 ve suda çözülmüş oksijen miktarı 7,4 mg/lt olarak ölçülmüştür.

### Bitki Materyali

Denemede kullanılan *O. vulgare* yaprakları yağ verim oranları dikkate alınarak çiçekli dönemlerinde bitki toplama merkezleriyle irtibat kurularak Akdeniz Bölgesinden temin edilmiştir. Bitki örneklerinin teşhisleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK tarafından yapılmıştır.

### Uçucu Yağlarının Eldesi ve GC-MS analizi

*O. vulgare* bitkisine ait uçucu yağ özel bir firmada distilasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın ana bileşenler yönünden kimyasal yapısı Gaz Kromatografi cihazıyla (GC/MS aparatı kullanılarak) belirlenmiştir.

GC-MS analizleri için QP 5050 mass selektif dedektörden oluşan GC/MS kullanılmıştır. Analizler Sonsuzer Hancı vd. (2003) ve Azaz vd. (2002)' na göre modifiye edilerek yapılmıştır. GC-MS analizleri QP 5050 mass selektif dedektörden oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Uçucu yağ örnekleri Cp WAX 52 CB kapillar kolondan geçirilmiştir (50 m x 0,32 mm x 1,2 µm). Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmıştır. Akış hızı 10 psi olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 60°C olup, 220°C' ye dakikada 2°C' lik artışla ulaşmıştır. 220°C' de 20 dk süreyle sabit tutulmuştur. Bileşenler kolonda kalma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada Wiley, Nist, Tutor bilgi bankasında spektrumların otomatik taranması ile analizler gerçekleştirilmiştir.

## Deneme Yeminin Hazırlanması

Denemede ortalama %40,51 ham protein, %11,66 ham yağ ve 3430 kcal/kg sindirilebilir enerji içeren ticari gökkuşağı alabalığı yemi kullanılmıştır. Denemede kullanılan ticari alabalık yeminin bileşenleri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Araştırmada kullanılan ticari yem bileşenleri

Temel hammaddeler	Deneme grupları ve kullanım oranları (%)				
	Kontrol	0,125	1,5	2,5	3,0
Balık unu	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Soya unu	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Buğday Gluteni	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Bonkalit	14,00	13,9875	13,85	13,75	13,7
Balık yağı	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Vitamin premiksi <sup>1</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Mineral premiksi <sup>2</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C vitamini	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Pelet bağlayıcı	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Antioksidan	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Diğer	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>O. vulgare</i> uçucu yağı	0	0,0125	0,15	0,25	0,3

<sup>1</sup>Vitamin premiksi.; her kg’da, 4 000 000 IU vitamin A, 480 000 IU vitamin D<sub>3</sub>, 40 000 mg vitamin E, 2400 mg vitamni K<sub>3</sub>, 4 000 mg vitamin B<sub>1</sub>, 6 000 mg vitamin B<sub>2</sub>, 40 000 mg niasin, 10 000 mg kalsiyum D-pantotenat, 4 000 mg vitamin B<sub>6</sub>, 10 mg vitamin B<sub>12</sub>, 100 mg D-biotin, 1 200 mg folik asit, 40 000 mg vitamin C ve 60 000 mg inositol içermektedir.

<sup>2</sup>Mineral premiksi.; her kg’da 23 750 mg Mn, 75 000 mg Zn, 5 000 mg Zn, 2 000 mg Co, 2 750 mg I, 100 mg Se, 200 000 mg Mg içermektedir.

Deneme yemleri ticari alabalık yemine *O. vulgare* uçucu yağının 0,125, 1,5, 2,5 ve 3,0 ml/kg olarak ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Uçucu yağ ilave edilmeyen yem kontrol yemi olarak kullanılmıştır. Yeme uçucu yağın ilavesi ayçiçeği yağı ile birlikte farklı oranlarda ilave edilerek spreyleme yöntemi ile yapılmıştır. Uçucu yağ içeriğindeki bileşenlerin etkinliklerinin korunması amacıyla yemler haftalık olarak hazırlanmış ve kapaklı cam şişelerde +4°C’de depolanmıştır.

## Büyüme Performansının Belirlenmesi

Besleme denemesi boyunca su sıcaklığına bağlı olarak tüm balıklar vücut ağırlığının %1,5-3’ü oranında yemlenmiştir. Deneme süresi toplam 90 gün olup, her 30 günde bir balıkların biyometrik (boy-ağırlık) ölçümleri yapılarak uçucu yağın büyüme, yem değerlendirme, yaşama oranı ve kondüsyon faktörüne etkileri belirlenmiştir. Denemede, yavru balıkların ağırlık ölçümleri, 0,001 g hassasiyetli dijital teraziyile, toplam boy ölçümleri ise 1 mm bölmeli ölçüm cetveli ile yapılmıştır.

Büyüme parametrelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Çetinkaya, 1995; De Silva ve Anderson, 1995; Goddard, 1996; Hoşsu vd., 2001)

Canlı Ağırlık Artışı (CAA) = Deneme Sonu Ortalama Ağırlığı - Deneme Baş Ortalama Ağırlığı

Oransal Büyüme (OB) = (Son Ort. Vücut Ağırlık - İlk Ort. Vücut Ağırlığı) / (İlk Ort. Vücut Ağırlık) x 100

Spesifik Büyüme Oranı (SBO) =  $100 \times [(\text{Ln Son Vücut Ağırlığı} - \text{Ln Başlangıç Vücut Ağırlığı}) / \text{Deneme gün sayısı}]$

Yem Değerlendirme Oranı (YDO) =  $\text{Ağırlık Kazanımı (g)} / \text{Yem Tüketimi (g)} \times 100$

Kondüsyon Faktörü (KF) =  $W/L^3 \times 100$  (W: vücut ağırlığı (g), L: Total boy (cm))

Yem Dönüşüm Oranı (FCR) =  $\text{Toplam Tüketilen Yem (g)} / \text{Toplam Kazanılan Canlı Ağırlık (g)}$

Yaşama Oranı (YO) =  $(\text{Ns/Nb}) \times 100$  (Ns: Deneme sonunda tankta kalan balık sayısı, Nb: Deneme başındaki balık sayısı)

### Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tespiti

*O. vulgare* uçucu yağını farklı oranlarda içeren yemler ile 56 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının (her gruptan altı balık) kuyruk sapı kesilerek kaudal venasından heparinli tüplere kan örnekleri alınmış ve 4°C’ de 700 devirde 30 dk süreyle santrifüjlenerek serumları çıkartılmıştır. Alınan serum örnekleri Süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD) ve Katalaz aktivitesinin (CAT) belirlenmesi amacıyla kullanılanlara kadar -20°C’ de saklanmıştır (Zheng vd., 2009).

Süperoksit dismutaz aktivitesi Woolliams vd. (1983)’ nin metoduna göre ölçülmüştür. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-4-iodophenly)-3-(4-nitrophenol)-5 phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmüştür. SOD aktivitesi U/g hemoglobin şeklinde verilmiştir.

Katalaz aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışılmıştır. CAT hidrojen peroksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizlemiştir. Çalışmada CAT aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm’ de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir. CAT tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edilmiştir. CAT aktivitesi kU/g hemoglobin olarak verilmiştir (Demir vd., 2007).

### Lizozim Aktivitesinin Tespiti

Serumda lizozim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla farklı oranlarda *O. vulgare* uçucu yağını içeren yemler ile 56 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarından kan örnekleri alınmıştır. Serum için kan örnekleri +4°C’ de 24 saat bekletildikten sonra 5000 devirde soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum kısmı -20°C’ de lizozim aktivitesi belirlenene kadar saklanmıştır. Lizozim aktivitesini belirlemek için diffüzyon agar metodu kullanılmıştır. Kısaca, PBS (Fosfat buffer saline) içine %0,5 Agar ve %0,12 g liyofilize *Micrococcus lysodeicticus* eklenerek hazırlanan ortamlar steril petri kaplarına aktarılmıştır. Petrielerde agar katılaştıktan sonra 5 mm çapında çukurlar açılmıştır. Daha önceden alınan serum örnekleri 25 µl olacak şekilde çukurlara ilave edilmiş ve petrieler 36°C’ de 20 saat inkübe edildikten sonra çukurların etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür (Ellis, 1996).

### in vivo Antibakteriyel Etkinin Tespiti

*O. vulgare* uçucu yağının *in vivo* antibakteriyel aktivitesinin tespiti amacıyla; balıklarda *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon uygulamaları yapılmıştır. Denemede kullanılan *V. anguillarum* suşu Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı’ ndan temin edilmiştir. Deneysel enfeksiyon uygulamasından önce, *V. anguillarum*

un LD<sub>70</sub> dozu belirlenmiştir. Bu amaçla her biri 25' er adet balıktan oluşan gruplara; 2.10<sup>6</sup>, 2.10<sup>4</sup>, 2.10<sup>3</sup>, 2.10<sup>2</sup> ve 2.10<sup>1</sup> kob/ml yoğunlukta bakteri i.p. yolla injekte edilmiştir. Balıklar 15 gün boyunca takip edilerek, deneysel enfeksiyon uygulamasından elde edilen ölüm oranlarına göre LD<sub>70</sub> dozu 2x10<sup>2</sup> kob/ml olarak belirlenmiştir.

Deneme yemleri, negatif ve pozitif kontrol ile 0,125, 1,5, 2,5 ve 3,0 ml/kg oranlarında uçucu yağ içeren toplam 6 gruptan oluşmuş ve balıklar 56 gün süre ile beslenmişlerdir. Negatif kontrol grubundaki balıkların yemlerine herhangi bir uçucu yağ ilavesi yapılmamıştır. Pozitif kontrol grubundaki balıklar da, 56 gün boyunca uçucu yağ ilavesi yapılmayan kontrol yemi ile beslenmiş ve bu sürenin sonunda *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla balıklara *V. anguillarum* (LD<sub>70</sub> dozunda) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Deneysel enfeksiyonu takiben 1 hafta sonra yani klinik olarak hastalık belirtileri şekillendikten sonra balıklar, oksiterasiklin (75 mg/kg) (Treves-Brown, 2000) ilaveli yem ile tedavi edilmişlerdir.

Deneysel enfeksiyondan sonra balıklar 14 gün boyunca düzenli izlenerek ölüm oranları belirlenmiştir. Bu süre içerisinde yeni ölmüş balıkların iç organlarından rekolonyasyon yapılmış ve spesifik ölümler araştırılmıştır. Balıklarda *O. vulgare* uçucu yağlarının *V. anguillarum*' a karşı sağladığı direncin belirlenmesi için balıkların nispi hayatta kalma oranları (RPS) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

RPS = [1-Uçucu yağla beslenen balıklardaki mortalite (%) / Kontrol grubundaki mortalite (%)] X 100

### Histolojik İncelemeler

*O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen gökkuşuğu alabalıklarında denemenin 56. gününde iç organlarından karaciğer, böbrek ve dalak örnekleri alınarak %10' luk nötral tamponlu formaldehitte fikse edilmiştir. Daha sonra alınan doku kesitleri hemotoksilen eozin boyama yöntemiyle boyanarak oluşan histopatolojik değişiklikler ışık mikroskopunda incelenmiştir (Bancroft ve Stevens, 1977; Luna, 1982).

### İstatistiksel Analizler

Denemede elde edilen veriler SPSS 18.0 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. Gruplar arasındaki ayırım Varyans Analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiş ve önem düzeyi P<0,05 olarak seçilmiştir (Özdamar, 2001).

## BULGULAR

### Bitki Uçucu Yağlarının GC-MS Analizi

*O. vulgare*' ye ait uçucu yağın kimyasal bileşen miktarları yüzde olarak Tablo 2' de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre uçucu yağın kimyasal kompozisyonundaki ana bileşenin karvakrol olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 2.** *O. vulgare* bitkisi uçucu yağ bileşenlerinin oransal değerleri (%)

Bitki türü	Rt	Bileşen	% Oransal değerler
<i>O. vulgare</i>	74,192	Carvacrol	94,31
	17,667	$\gamma$ -terpinene	1,53
	19,217	Cymene	1,29
	39,917	Linalool	1,25
	46,117	İsoborneol	1,13
	47,325	Myrcene	0,49

### Büyüme Performansı Sonuçları

Farklı oranlarda *O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen gökkuşacağı alabalıklarında hesaplanan biyometrik parametreler Tablo 3' de verilmiştir.

**Tablo 3.** Farklı oranlarda *O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen gökkuşacağı alabalıklarında biyometrik parametreler (X $\pm$ SD)\*

	Deneme grupları				
	Kontrol	0,125 ml/kg	1,5 ml/kg	2,5 ml/kg	3,0 ml/kg
Başlangıç ağırlığı (g)	27,66 $\pm$ 3,98	27,91 $\pm$ 4,08	27,86 $\pm$ 3,52	27,56 $\pm$ 3,94	28,05 $\pm$ 3,70
Final ağırlığı (g)	75,98 $\pm$ 15,87 <sup>c</sup>	79,36 $\pm$ 9,83 <sup>c</sup>	90,78 $\pm$ 12,19 <sup>a</sup>	85,65 $\pm$ 11,76 <sup>b</sup>	90,73 $\pm$ 12,68 <sup>a</sup>
Canlı ağırlık artışı (CAA) (g)	48,31 $\pm$ 2,18 <sup>b</sup>	51,45 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	62,91 $\pm$ 5,57 <sup>a</sup>	58,08 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>	62,68 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>
Oransal büyüme (OB)	174,60 $\pm$ 6,17 <sup>b</sup>	184,38 $\pm$ 7,52 <sup>b</sup>	225,78 $\pm$ 20,00 <sup>a</sup>	210,73 $\pm$ 6,78 <sup>a</sup>	223,47 $\pm$ 5,06 <sup>a</sup>
Spesifik büyüme oranı (SBO)	4,30 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	4,37 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	4,59 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	4,51 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	4,59 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Yem dönüşüm oranı (FCR)	1,31 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	1,38 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,14 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	1,26 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,11 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
Yaşama oranı (YO)	96,66 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	98,09 $\pm$ 0,82 <sup>ab</sup>	99,04 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	99,52 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	99,52 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>
Kondüsyon faktörü (KF)	0,99 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,95 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,03 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
Yem değ. oranı (YDO)	75,87 $\pm$ 2,20 <sup>b</sup>	72,19 $\pm$ 2,76 <sup>b</sup>	87,92 $\pm$ 8,56 <sup>a</sup>	78,97 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>	89,44 $\pm$ 3,92 <sup>a</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki bakımından önemlidir (P<0,05)

*O. vulgare* ile yapılan besleme denemesinde final ağırlık değeri, canlı ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı, oransal büyüme ve kondüsyon faktörünün 1,5 ml/kg, 2,5 ml/kg ve 3,0 ml/kg gruplarında 0,125 ml/kg ve kontrol grubuna göre daha iyi değerlerde olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Denemede final ağırlık değeri, canlı ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı ve oransal büyüme değerleri sırasıyla 90,78 $\pm$ 12,19 g, 62,91 $\pm$ 5,57 g, 4,59 $\pm$ 0,09 ve 225,78 $\pm$ 20,00 g olarak en iyi *O. vulgare* 1,5 ml/kg grubunda tespit edilmiştir. Bu grubu sırasıyla 3,0 ml/kg ve 2,5 ml/kg grupları takip etmiştir. 0,125 ml/kg oranında uçucu yağ içeren yemle beslenen grup ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (P<0,05). En iyi yem dönüşüm oranı 3,0 ml/kg grupta (1,11 $\pm$ 0,04) elde edilmiş ve bu grubu sırasıyla 1,5 ml/kg (1,14 $\pm$ 0,10) ve 2,5 ml/kg (1,26 $\pm$ 0,02) grupları izlemiştir. Yem değerlendirme oranı ise en iyi 3,0 ve 1,5 ml/kg

gruplarında olduğu ve diğer gruplar ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ).

Yaşama oranı bakımından  $99,52\pm0,82$  ile *O. vulgare* 2,5 ve 3,0 ml/kg gruplarının en iyi olduğu tespit edilmiştir. Bu grupları sırasıyla 1,5 ml/kg ( $99,04\pm0,82$ ) ve 0,125 ml/kg ( $98,09\pm0,82$ ) izlemiştir. En düşük yaşama oranı  $96,66\pm0,82$  ile kontrol grubunda elde edilmiştir ( $P<0,05$ ).

### **In vivo Antibakteriyel Etki Sonuçları**

*V. anguillarum* ile yapılan deneysel enfeksiyon uygulaması sonucunda, *O. vulgare* ile beslenen gökkuşacağı alabalıklarında ölüm oranlarının negatif kontrol grubuna (%70) göre önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). En düşük mortalite oranı (%27,5), 3,0 ml/kg oranında *O. vulgare* uçucu yağını içeren yemle beslenen grupta tespit edilmiştir. *V. anguillarum* verilen deneme gruplarında nispi yaşama oranına bakıldığında en yüksek değerler sırasıyla 3,0 ml/kg ve 2,5 ml/kg dozlarında ilave edilen yemle beslenen balık gruplarında bulunmuştur. En düşük RPS değerinin bulunduğu *O. vulgare* 0,125 ml/kg ile pozitif kontrol grubu istatistiksel olarak benzerlik görülmüştür ( $P<0,05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4.** *V. anguillarum* enfekte edilmiş gökkuşacağı alabalıklarında mortalite oranları ve RPS değerleri

Gruplar	Mortalite oranı (%)	RPS değerleri
<i>O. vulgare</i> 0,125 ml/kg	57,5	17,85 $\pm$ 5,05 <sup>a</sup>
<i>O. vulgare</i> 1,5 ml/kg	47,5	46,42 $\pm$ 5,05 <sup>b</sup>
<i>O. vulgare</i> 2,5 ml/kg	35	50,00 $\pm$ 10,10 <sup>b</sup>
<i>O. vulgare</i> 3,0 ml/kg	27,5	60,71 $\pm$ 5,05 <sup>b</sup>
Pozitif Kontrol (Oksiterasiklin 75 mg/kg)	52,5	25,00 $\pm$ 5,05 <sup>a</sup>
Negatif Kontrol	70	-

\*: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel bakımından önemlidir ( $P<0,05$ )

### **Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Lizozim Aktivitesine Ait Bulgular**

*O. vulgare* uçucu yağları ile beslenen gökkuşacağı alabalıklarında plazma katalaz aktivitesinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir ( $P<0,05$ ) (Tablo 5). Plazmada süperoksit dismutaz aktivitesinin ise en yüksek 1,5 ml/kg (789,52 $\pm$ 16,63) grubunda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu grubu sırasıyla 2,5 ml/kg, 3,0 ml/kg, kontrol ve 0,125 ml/kg grupları izlemiştir ( $P<0,05$ ) (Tablo 5).

Lizozim aktivitesinin *O. vulgare* 3,0 ml/kg ile beslenen grupta en yüksek (17,66 $\pm$ 2,51) olduğu tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ) (Tablo 5).



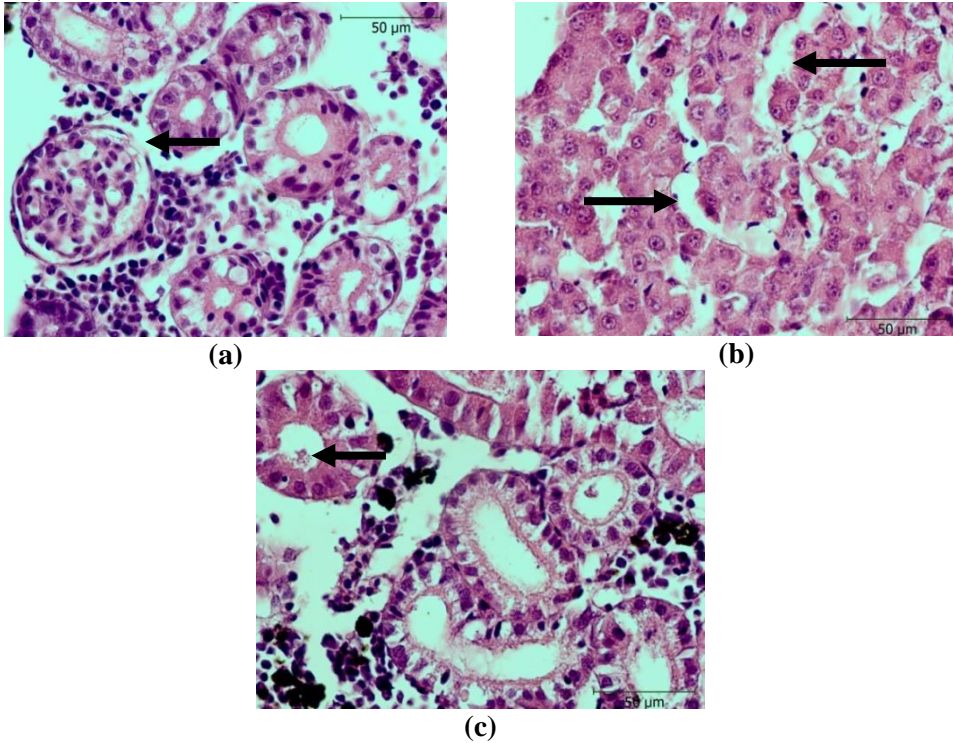
**Tablo 5.** *O. vulgare* uçucu yağları ile beslenen gökkuşağı alabalıklarında antioksidan ve lizozim aktivite sonuçları

Gruplar	Plazma katalaz aktivitesi (CAT)	Plazma süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD)	Lizozim aktivitesi (mg/ml)
<i>O. vulgare</i> 0,125 ml/kg	29,73±3,76	669,66±85,10 <sup>b</sup>	6,66±1,52 <sup>c</sup>
<i>O. vulgare</i> 1,5 ml/kg	25,04±4,21	789,52±16,63 <sup>a</sup>	10,00±0,00 <sup>b</sup>
<i>O. vulgare</i> 2,5 ml/kg	30,98±5,22	782,12±12,65 <sup>a</sup>	10,00±1,00 <sup>b</sup>
<i>O. vulgare</i> 3,0 ml/kg	26,15±8,95	782,03±43,25 <sup>a</sup>	17,66±2,51 <sup>a</sup>
Kontrol	26,25±2,12	706,38±25,63 <sup>ab</sup>	8,00±1,00 <sup>bc</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki bakımdan önemlidir (P<0,05)

### Histolojik İncelemelere Ait Sonuçlar

Histolojik incelemelerde kontrol grubu ile mukayese edildiğinde uçucu yağ ilaveli yemle beslenen gruplarda konsantrasyon farkı olmaksızın karaciğer hücrelerinde gevşek bir görünüm ve böbrek dokusuna ait glomerulus ve tübüllerde nekroz dikkati çekmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** (a) 0,125 ml/kg oranında *O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen gruplarda posterior böbrekte glomerulusta nekroz (x40) (b) 1,5 ml/kg oranında *O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen gruplarda karaciğer hücrelerinde gevşek görünüm (x40) (c) 3,0 ml/kg oranında *O. vulgare* uçucu yağı ile beslenen gruplarda posterior böbrekte tübüler nekroz (x40)

## TARTIŞMA

Akuakültürde balıkların büyümesini ve sağlığını artırmak amacı ile çeşitli bitkisel ürünlerin kullanılması oldukça popüler bir yaklaşımdır (Gatlin vd., 2007; Ji vd., 2007; Erol-Florian vd., 2011; Ndong ve Fall, 2011). Son yıllarda yapılan araştırmalarda tıbbi bitkilerin balıklarda büyüme parametreleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Ji vd., 2007; Aly vd., 2008; Immanuel vd., 2009; Ahilan vd., 2010; Ndong ve Fall, 2011; Oskoi vd., 2012). Özellikle gökkuşağı alabalığını da içeren birçok balık türünde bitkisel ürünler ve etken maddeleri ile yapılan beslemenin büyüme üzerinde olumlu etkileri görülmektedir (Düğenci vd., 2003; Zheng vd., 2009).

Lamiceae familyasına ait kekik türleri antibakteriyel, antifungal, antioksidan, anti-enflamatuar özelliklerinin yanı sıra sindirimi kolaylaştırma özellikleri nedeniyle büyüme destekleyici olarak kullanım potansiyeline sahiptir (de Moraes França Ferreira vd., 2014). Kanal yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*) *O. heracleoticum* (Zheng vd., 2009), gökkuşağı alabalıklarında *O. vulgare* (Ahmadifar vd., 2011) ve *O. onites* (Diler vd., 2016), levrek ve tilapialarda *Thymus vulgaris* (Yılmaz vd., 2012; Shehata vd., 2013) uçucu yağları ile yapılan besleme çalışmalarında büyüme performansında artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kekik bitkisinin temel bileşenleri olan timol ve karvakrolün farklı balık türlerinde büyüme üzerine etkileri çalışılmıştır. Giannenas vd. (2012), timol ilaveli yemle beslenen gökkuşağı alabalıklarında ağırlık kazancının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Karvakrol ilaveli yemle beslenen gruplarda ise büyüme parametrelerinde herhangi bir artışın olmadığı belirlenmiştir. Benzer bir şekilde Volpatti vd. (2013), levrek balıklarında karvakrolün büyüme performansı üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Ahmadifar vd. (2014) yavru mersin (*Huso huso*) balıklarının diyetlerine ilave edilen timol ve karvakrol karışımının final ağırlık ve spesifik büyüme oranını artırdığını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada *O. vulgare* uçucu yağı ile beslemenin gökkuşağı alabalıklarında büyüme performansı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu saptanmıştır. En iyi final ağırlık değeri, canlı ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı, kondüsyon faktörü ve oransal büyüme 1,5 ml/kg ve 3,0 ml/kg uçucu yağ ile beslenen balıklarda tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). *O. vulgare* L. ile beslenen balıklarda en iyi yem dönüşüm değerleri 1,5 ml/kg ve 3,0 ml/kg gruplarında elde edilmiştir. Yaşama oranları bakımından tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir ( $P<0,05$ ). Araştırma bulgularımız Zheng vd. (2009), Ahmadifar vd. (2011), Yılmaz vd. (2012), Shehata vd. (2013), Ahmadifar vd. (2014) ve Diler vd., (2016)' in çalışmaları ile desteklenmektedir. Giannenas vd. (2012) ve Volpatti vd. (2013)' den ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Uçucu yağların büyüme üzerindeki olumlu etkileri, onların aromatik özelliklere sahip olması nedeniyle balıkların yem alımı artırdığı ve ağırlık kazancının artması ile açıklanmaktadır (Abdel Latif ve Khalil, 2014). Ayrıca bitkilerin biyoaktif bileşenlerinin sindirim enzimlerini artırarak nutrientlerin absorpsiyonu sağlamaktadır (Radhakrishnan vd., 2015).

Kekik türleri, yüksek düzeyde uçucu yağ içermekte ve bu yağların ana bileşeni olan timol ve karvakrolün yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Giannenas vd. (2012) karvakrol ve timol ilaveli yemle 8 hafta beslemenin sonunda gökkuşağı alabalıklarının filetosunda antioksidan aktivite için glutathion reduktaz, glutathion-S tranferaz, malondialdehit, lizozim, nitrit oksit, toplam komplement konsantrasyonu, katalaz aktivitesini belirlemişlerdir. Sonuçta karvakrol ve timol ilaveli yemle beslenen gruplarda, malondialdehit sayısında bir düşüş olmasına rağmen, glutathion reduktaz ve

glutathion-S tranferaz aktivitesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Karvakrol ilaveli yemle beslenmiş gruplarda katalaz aktivitesi lizozim ve toplam komplement konsantrasyonunun yüksek olduğu ve antioksidan koruyucu kapasitenin arttığı görülmüştür. Benzer şekilde, *O. heracleoticum* uçucu yağı ile beslenen kanal yayın balıklarında plazmada süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin önemli oranda yükseldiği tespit edilmiştir (Zheng vd., 2009). Çalışmamızda da uçucu yağ ilaveli yemlerle beslenen balıklarda, plazma süperoksit dismutaz aktivitesinde artış olduğu ve en yüksek değer 1,5 ml/kg grubunda tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). Bununla birlikte, uçucu yağ ilavesinin plazma katalaz seviyelerinde bir değişime neden olmadığı görülmüştür. Lizozim balık patojenlerine karşı korunmada önemli bir parametre olup bu çalışmada lizozim aktivitesinin sadece *O. vulgare* L. 3,0 ml/kg ile beslenen balıklarda bir artış göstermiştir ( $P<0,05$ ). Karagouni vd. (2015) yaptıkları çalışmada *Origanum minutiflorum*' un *Diplodus puntazzo*' da lizozim aktivitesini artırdığını belirlemiştir. Araştırma sonuçlarımız *O. vulgare*' de plazmada süperoksit dismutaz aktivitesinin artması nedeniyle *in vivo* antioksidan aktivitenin olumlu etkilendiğini ve Zheng vd. (2009)' in bulgularını desteklediği tespit edilmiştir.

Hızla gelişmekte olan su ürünleri yetiştiriciliğinde intensif üretim şartlarında infeksiyöz hastalıklar önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Akuakültürde özellikle balık yemlerine bitkisel maddelerin ilavesi sadece büyümeyi artırıcı olarak değil aynı zamanda balıklarda bağışıklığın geliştirilmesi ve hastalıkların kontrolü amacıyla yapılmaktadır (Jian ve Wu, 2003).

Farklı aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bilinir (Hammer vd., 1999; Baydar vd., 2004). *Origanum* cinsi bitkilerin antibakteriyel etkiye sahip karvakrol, timol, p-cymen, y-terpinen gibi çok sayıda aktif metabolitleri vardır (Karausou & Kokkini, 2003). Bu çalışmada karvakrol (%94,31) *O. vulgare*' nin uçucu yağında antimikrobiyal etkisi olan ana bileşendir. Uçucu yağların antibakteriyel mekanizmaları tam bilinmemekle birlikte kimyasal yapıları ve lipofilik özellikleri önemli rol oynamaktadır. Karvakrol sitoplazmik membran geçirgenliğini artırdığı için ve lipopolisakkaritler üzerindeki etkisi nedeniyle Gr (-) bakterilerin membran bütünlüğünü bozmaktadır.

Çalışmamızda *O. vulgare* uçucu yağı ile beslemenin gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum*' a karşı koruma sağlandığı ve en düşük konsantrasyonda (0,125 ml/kg) bile negatif kontrolden daha iyi nispi yaşama oranı verdiği görülmüştür. *O. vulgare* uçucu yağının yüksek oranda karvakrol içermesi nedeniyle patojenlere direnç sağlayabildiği sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda *O. heracleoticum* uçucu yağının kanal yayın balıklarında *A. hydrophila*' ya (Zheng vd., 2009), *O. vulgare* ekstraktının tilapialarda *V. alginolyticus*' a (Abdel-Latif ve Khalil, 2014), *O. onites* uçucu yağının gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae*' ye (Diler vd., 2016) ve karvakrol ile beslemenin gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum*' a (Volpatti vd., 2013) karşı direnç sağladığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada bulgularımız Zheng vd. (2009), Abdel-Latif ve Khalil (2014), Diler vd. (2016) ve Volpatti vd. (2013)' ün sonuçlarını desteklemiştir.

*O. vulgare*' nin kimyasal kompozisyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ana bileşenin karvakrol olmakla birlikte (Goliaris vd., 2003; Viuda-Martos vd., 2007; Souza vd., 2008; De Martino vd., 2009; Derwich vd., 2010; Bejaoui vd., 2013; Stojkovic vd., 2013) terpineol, caryophyllene, thymoquinene gibi bileşenlerden de meydana gelebileceği tespit edilmiştir (Milos vd., 2000; Radusiene vd., 2005; Cleff vd., 2010). Bu çalışmada ise *O. vulgare* uçucu yağının kimyasal kompozisyonunda karvakrol (%94,31), myrcene (%0,49),

isoborneol (%1,13), linalool (%1,25), cymene (%1,29) ve  $\gamma$  terpinen (%1,53) bileşenleri tespit edilmiş olmakla birlikte timol bileşenine rastlanılmamıştır.

Bitkisel ürünlerin yem katkı maddesi olarak kullanılması halinde dokularda görülen histopatolojik değişimler çeşitli araştırmalar ile ortaya konmuştur. Mohi-Eldin vd. (2012), ginseng ekstraktı ve sarımsak tozunun dişi ratlarda böbrek tübüllerinde vakuolar dejenerasyon ve nekrozise sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Zakes vd. (2008), *Astragalus radix* ve *Lonicera japonica* bitkilerinin yavru *Sander lucioperca* larda karaciğer ve orta bağırsak üzerindeki histolojik etkilerini araştırmışlar ve karaciğer parankimasında bazı farklılıklar oluşturduğu, hücre sitoplazmalarında glikojen ve yağ damlaları ve inklüzyon oluşumu ve bazı patolojik değişimlerin meydana geldiğine dikkati çekmiştir. İki bitkinin karışım halinde verildiği grupta nekrotik değişiklikler daha belirgin olmuştur. Bu araştırmadaki histopatolojik incelemelerde *O. vulgare* L. uçucu yağı ile 56 gün beslemenin gökkuşağı alabalıklarında karaciğer hücrelerinde gevşek bir görünüm ve böbrek dokusuna ait glomerulus ve tübüllerde nekroza yol açtığı dikkati çekmiştir. Söz konusu bulgularımız Zakes vd. (2008)' in sonuçlarını desteklemiş ve bitkisel ürünlerin balıklarda toksik etkiye neden olmamakla birlikte bazı histopatolojik değişimlere neden olabileceğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada, *Origanum vulgare* L. uçucu yağının gökkuşağı alabalığı üzerinde *Vibrio anguillarum*' a karşı *in vivo* antibakteriyel aktivitesi ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca kullanılan uçucu yağın balıklarda büyüme teşvik edici ve antioksidan aktiviteyi artırıcı etkiye sahip oldukları da tespit edilmiştir. Böylece *O. vulgare* uçucu yağının antibakteriyel ve antioksidan özellikleri yanında büyüme performansı üzerine olumlu etkileri neticesinde su ürünleri yetiştiriciliğinde alternatif yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Latif, H.M.R., & Khalil, R.H. (2014). Evaluation of two phytobiotics, *Spirulina platensis* and *Origanum vulgare* extract on growth, serum antioxidant activities and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(5), 250-255.
- Abdel-Tawwab, M., Azza, M., & Abdel-Rahman, N.E.M.I. (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(1-4), 185-189.
- Abdel-Tawwab, M. (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, 203-213.
- Ahilan, B., Nithiyapriyatharshini, A., & Ravaneshwaran, K. (2010). Influence of certain herbal additives on the growth, survival and disease resistance of goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus). *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 6(1), 5-11.
- Ahmadifar, E., Falahatkar, B., & Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1057-1060.
- Ahmadifar, E., Mansour, M.R., Amirkolaie, A.K., & Rayeni, M.F. (2014). Growth efficiency, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of thymol-carvacrol. *Animal Feed Science and Technology*, doi: 10.1016/j.anifeeds.2014.08.012.

- Aly, S.M., Atti, N.M.A., & Mohamed, M.F. (2008). Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 12–14 October, Cairo, Egypt, 277-296.
- Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, V., 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 (1-4), 26-33.
- Azaz, A.D., Demirci, F., Satıl, F., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. (2002). Bazı *Satureja* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. 14. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Bancroft, J.D., & Stevens, A. (1977). *Theory and practice of histological techniques*. Edinburgh, London and New York: Churchill Livingstone.
- Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., & Karadogan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15, 169–172.
- Bejaoui, A., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(32), 2429-2435.
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R., Xavier, M., Schuch, L.F., Meireles, M.C.A., Rodrigues, M.R.A., & Mello, J.R.B.D. (2010). *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 116-123.
- Çetinkaya, O. (1995). *Balık Besleme, Ders Kitabı*. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E., & Senatore, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, 14, 2735-2746.
- De Moraes França Ferreira, P., da Silva Nascimento, L., Coelho Dias, D., da Veiga Moreira, D. M., Lúcia Salaro, A., de Freitas, M.B.D., Carneiro, A.P.S., & Zuanon, J.A.S. (2014). Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 28-34.
- De Silva, S.S., & Anderson, T.A. (1995). *Fish Nutrition in Aquaculture*. London: Chapman and Hall.
- Demir, M., Vural, C.D., Yılmaz, N., Yüksel, Ş., Vural, H., & Sezer, M.T. (2007). Tek Seans Hemodiyalizinde Çeşitli Oksidatif Stres Markerları Üzerine Etkisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 5 (2), 74-77.
- Derwich, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A., & Taouil, R. (2010). Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of *Origanum vulgare* from Morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 5(2), 120-129.
- Diler, Ö., Görmez, Ö., Diler, İ., & 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*, doi:10.1111/anu.12451.
- Düğenci, S.K., Arda, N., & Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 99-106.
- Ellis, A.E. (1996). *Lysozyme Assay*. In *Techniques in Fish Immunology* (Eds: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P., Anderson, B.S. Roberson, W.B., Mulswink.), 101- 103.
- Erol-Florian, G., Şara, A., Molnar, F., & Bençea, M. (2011). The influence of some phytoadditives on growth performances and meat quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 13-18.
- Gatesoupe, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 19, 147-165.

- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551-579.
- Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, Mavridis, M.S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350-353, 26-32.
- Goda, A.M.A.S. (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, 205-214.
- Goddard, S. (1996). *Feed Management in Intensive Aquaculture*. USA: Chapman and Hall Press.
- Goliaris, A.H., Chatzopoulou, P.S., & Katsiotis, S.T. (2003). Production of new Greek oregano clones and analysis of their essential oils. *Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants*, 10(1), 29-35.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Sepahi, A., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A.A., & Akbari, M. (2013). Effect of dietary *Aloe vera* on growth performance, skin and gastrointestinal morphology in rainbow trout. *Turkish Journal of Fish and Aquatic Science*, 13, 367-373.
- Hermann, J.R., Honeyman, M.S., Zimmerman, J.J., Thacker, B.J., Holden, P.J., & Chang, C.C. (2003). Effect of dietary *Echinacea purpurea* on viremia and performance in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 81, 2139-2144.
- Hoşsu, B., Korkut, A.Y., & Firat, A. (2001). *Balık Besleme ve Yem Teknolojisi I* (II.Baskı). İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
- Immanuel, G., Uma, R.P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Punitha Peter, S.M., Michael Babu, M., & Palavesam, A. (2009). Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 74, 1462-1475.
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture: review. *Journal of Fish Diseases*, 25, 633-642.
- Ji, S.C., Takaoka, O., Jeong, G.S., Lee, S.W., Ishimaru, K., Seoka, M., & Takii, K. (2007). Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73, 63-69.
- Jian, J., & Wu, Z. (2003). Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture*, 218, 1-9.
- Karagouni, E., Athanassopoulou, F., Lytra, A., Komis, C., & Dotsika, E. (2005). Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary Parasitology*, 134, 215-228.
- Karousou, R., & Kokkini, S. (2003). The genus *Origanum* (Labiatae) in Crete: distribution and essential oils. *Bocconea*, 16, 717-721.
- 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, 1-14.
- Luna, G.L. (1982). *Manual of Histologic Staining Methods*. New York: Mc Graw-Hill Co.
- Milos, M., Mastelic, J., & Jerkovic, I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*, 71, 79-83.
- Mohi-Eldin, M.M., Mostafa, A.M., & Abd-El kader, A.A. (2012). The protective effects of ginseng plant extract (ginsana) and garlic powder against the bad effects of lambda-cyhalothrin

- insecticide on kidneys of female rats. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 4 (1), 75-85.
- 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.
- Oskoi, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A.P., & Sadeghi, E. (2012). Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38 (4), 1029-1034.
- Özdamar, K. (2001). *Tıp Biyoloji Eczacılık ve Diş Hekimliği Öğrencileri için SPSS ile Biyoistatistik*. Kaan Kitabevi, 452s.
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Muralisankar, T., & Shanthi, R. (2015). Effects of native medicinal herbs (*Alternanthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth performance, digestive enzymes and biochemical constituents of the monsoon river prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Aquaculture Nutrition*, 21(4), 496-506.
- Radusiene, J., Judpintienė, A., Pečiulytė, D., & Janulis, V. (2005). Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. *Biologija*, 4, 53-58.
- Rattanachaiakunsopond, P., & Phumklachor, P. (2010). Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* *in vitro* and in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *African Journal of Microbiology Research*, 4, 420-425.
- Schnick R.A., Alderman D.J., Armstrong R., Le Gouvello R., Ishihara S., Lacierra E.C., Percival S., & Roth M. (1997). Worldwide aquaculture drug and vaccine registration progress. *B. Eur. Assoc. Fish Path.*, 17, 251-260.
- Shehata, S.A., Mohamed, M.S., & Abd El-Shafi, S. (2013). Antibacterial activity of essential oils and their effects on Nile tilapia fingerlings performance. *Journal of Medical Sciences*, 13, 367-372.
- Sonsuzer Hancı, S., Şahin, S., & Yılmaz, L. (2003). Isolation of volatile oil from Thyme (*Thymra spicata*) by steam distillation. *Nahrung/Food*, 47(4), 252-255.
- Souza, E.L., Barros, J.C., Oliveira, C.E.V., & Conceição, M.L. (2008). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 308-311.
- Stojkovic, D., Jasmina, G., Ana, C., Nikolic, M., Ristic, M., Jovana, S., & Marina, S. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*, 65(2), 639-643.
- Treves-Brown, K.M. (2000). *Applied Fish Pharmacology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Turi L. D., Ragni M., Jambrenghi A. C., Lastilla M., Vicenti A., Colonna M. A., Giannico F., & Vonghia G. (2009). Effect of dietary rosemary oil on growth performance and flesh quality of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *18th Nat. Congr. Ital. J. Anim. Sci.*, Vol. 8 (Suppl. 2). 857-859.
- Turker, H., Yıldırım, & A.B. (2015). Screening for antibacterial activity of some Turkish plants against fish pathogens: a possible alternative in the treatment of bacterial infections. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 281-288.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J.A. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chimica Slovenica*, 54, 921-926.
- Volpatti, D., Chiara, B., Francesca, T., & Marco, G. (2013). Growth Parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45(1), 31-44.

- Won, M.M., Cha, E.J., Yoon, O.K., Kim, N.S., Kim, K., & Lee, D.S. (2008). Use of headspace mulberry paper bag micro solid phase extraction for characterization of volatile aromas of essential oils from Bulgarian rose and provence lavender. *Analytica Chimica Acta*, 631(1), 54-61.
- Woolliams, J.A., Wiener, G., Anderson, P.H., & McMurray, C.H. (1983). Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Research in Veterinary Science*, 34(3), 253-256.
- Yılmaz, S., Ergün, S., & Çelik, E.Ş. (2012). Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): change in body composition and some blood parameters. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 1(3), 217-222.
- Zakes, Z., Kowalska, A., Demska-Zakes, K., Jeney, G., & Jeney, Z. (2008). Effect of two medicinal herbs (*Astragalus radix* and *Lonicera japonica*) on growth performance and body composition of juvenile pikeperch (*Sander lucioperca* L.). *Aquaculture Research*, 39, 1149-1160.
- Zheng, Z.L., Tan, J.Y.W., & Liu, H.Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292 (3-4), 214-218.