

## *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* (Herbert) Mathew Bitki Ekstraktının Avrupa Deniz Levrek Balığı (*Dicentrarchus labrax*, L.1758) Doğal Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

Canan ÖNTAŞ<sup>1\*</sup>, Gülşen ULUKÖY<sup>1</sup>, Esin BABA<sup>1</sup>, Ramazan MAMMADOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Muğla, Türkiye

<sup>2</sup>Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: [cananontas@mu.edu.tr](mailto:cananontas@mu.edu.tr)

**Araştırma Makalesi**

Geliş 20 Eylül 2019; Kabul 04 Aralık 2019; Basım 01 Mart 2020.

**Alıntılama:** Öntaş, C., Uluköy, G., Baba, E., & Mammadov, R. (2020). *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* (Herbert) Mathew bitki ekstraktının avrupa deniz levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*, L.1758) doğal bağışıklık sistemi üzerine etkisi. *Acta Aquatica Turcica*, 16(1), 148-157. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.622606>

### Özet

Bu çalışmada *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* (Herbert) Mathew geofit bitki ekstraktı iki farklı konsantrasyonda (0,5 ve 2 mg/balık) intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle Avrupa deniz levreğine (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) uygulanmış ve bağışıklık sistemine etkisi araştırılmıştır. Enjeksiyon sonrası 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde balıklardan kan örnekleri alınmıştır. Doğal bağışıklık ile ilgili parametrelere olan toplam lökosit sayısı, hematokrit seviye, NBT(+) hücre sayısı, lizozim aktivitesi ve serum total protein miktarındaki değişimler tespit edilmiştir. *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* uygulanan deneme gruplarında kontrol grubuna kıyasla doğal bağışıklık sisteminin aktifleşerek, NBT(+) hücre sayısının 21. günde, toplam lökosit sayısının 14.günde, serum total protein miktarının 14. ve 21. günlerde ve serum lizozim aktivitesinin 21. günde en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 2 mg/balık dozunda uygulanan *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* ekstraktının 0,5 mg/balık dozuna kıyasla daha etkin olduğu bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** İmmunostimulant, bitki ekstraktı, bağışıklık sistemi, *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus*, *Dicentrarchus labrax*.

**Effects of *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* (Herbert) Mathew Plant Extract on the Innate Immune System of European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.1758)**

### Abstract

In this study, *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* (Herbert) Mathew geophyte plant extract was applied to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) in two different concentrations (0.5 and 2 mg/fish) by intraperitoneal injection method and its effect on the immune system was investigated. After injection on the 7th, 14th, 21st, 28th and 35th days, blood samples were collected from fish. Some of the innate immune related parameters in blood and serum samples such as total leukocyte count, hematocrit level, NBT (+) cell count, lysozyme activity and serum total protein content were determined. *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* plant extract treated groups exhibited significant immunostimulatory effect, increased NBT (+) cell count at 21st day, total leukocyte count in 14th day, serum total protein level at 14th and 21st day and serum lysozyme activity at 21st day compared with the control group. As a result of plant extract application, the 2 mg/fish group was found to be more effective than the 0.5 mg/fish group.

**Keywords:** Immunostimulant, plant extract, immune system, *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus*, *Dicentrarchus labrax*.

### GİRİŞ

Günümüzde balık yetiştiriciliği, artan dünya nüfusuna paralel olarak ortaya çıkan hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında büyük ekonomik öneme sahip olan bir sektördür (Done ve Halden, 2015; Wang vd., 2016). Balık yetiştiriciliği genellikle intensif ve yarı intensif sistemlerde yapılmaktadır. Ülkemiz balık yetiştiriciliği toplam 314.537 ton olup bunun 116. 915 tonunu Avrupa deniz levreği üretimi oluşturmaktadır (TUİK, 2018).

Balık yetiştiriciliğinde amaç, gelişen teknoloji ile birlikte en ekonomik yolla kaliteli ve sağlıklı balık üretimi yapmaktır (Terech-Majewska, 2016). Ancak çeşitli patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyöz hastalıklar balık çiftliklerinde yüksek oranda ölümlere neden olabilmektedir. Yetiştiricilik koşullarında yaşanan çeşitli problemler örneğin; stok yoğunluğunun fazla olması, su

kalitesi ve su sıcaklığındaki ani değişimler, balıkların yetersiz beslenmesi ve olumsuz çevre şartları balıklarda stresle birlikte bağışıklık sisteminin zayıflamasına neden olmaktadır. Zayıflayan bağışıklık sistemi ile birlikte balıklar patojenlere karşı daha savunmasız bir hale gelmekte ve hastalıklar çok daha hızlı bir şekilde ortaya çıkarak yayılmaktadır (Awad ve Awaad, 2017). Hastalıklarla mücadelede birçok kemoterapötik madde kullanılmaktadır. Özellikle bakteriyel balık hastalıklarında yaşanan kayıpları önlemek için antibiyotikler tercih edilmektedir. Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere örnek olarak florfenikol, sulfadiazin+trimetoprim, oksitetrasiklin, amoksisilin, oksolinik asit ve enrofloksasini örnek olarak verebiliriz (Akşit, 2016). Antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı kullanımı çeşitli negatif etkilere yol açmaktadır. Balık çiftliklerinde antibiyotiklerin hastalık ortaya çıkmadan profilaktif amaçla ve büyüme performansını arttırmak için kullanıldığı bilinmektedir (Rico vd., 2013; Pes vd., 2018). Aşırı antibiyotik kullanımı bakteriyel direnç gelişimine, çevreye antibiyotik kontaminasyonuna, balıklarda bağışıklık sisteminin baskılanmasına, toksik etkiye ve kas dokusunda antibiyotik kalıntısının besin zinciri yoluyla insanlara geçmesine sebep olabilmektedir (Lunden vd., 1998; Ren vd., 2014; Sukumaran vd., 2016). Antibiyotiklerin bilinçsiz ve yoğun kullanımının sebep olduğu bu negatif etkilerden dolayı balık yetiştiriciliğinde hastalıklardan korunmak amacıyla profilaktif metotların kullanımı giderek önem kazanmakta ve yaygınlaşmaktadır. Balık bağışıklık sistemini uyararak aktive olmasını sağlayan ve güçlendiren profilaktif metotların başında aşı, probiyotik ve immünostimulant uygulamaları yer almaktadır. (Beltrán vd., 2018). İmmünostimulantlar bağışıklık sistemini güçlendiren, antijen ile verildiğinde kazanılmış bağışıklık sistemini uyaran yalnız verildiklerinde ise doğal bağışıklık sistemini harekete geçiren doğal veya sentetik maddelerdir (Candan ve Karataş, 2010). Balık sağlığına olumlu yönde etki eden birçok tıbbi bitkinin immünostimulant olarak kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, terapötik maddelere alternatif olarak balık yetiştiriciliğinde antimikrobiyal özelliğe sahip, anti stresör, iştah arttırıcı, büyüme ve hayatta kalma oranını arttıran ve bağışıklık sistemini güçlendiren çeşitli tıbbi bitkilerin kullanımında artış olduğu görülmektedir (Hai, 2015 ; Ngugi vd., 2015; Sukumaran vd., 2016; Yılmaz vd., 2016a; Diler vd., 2018; Bilen vd., 2018). Bitkisel immünostimulantlar, fenolik, polifenolik, lektin, alkaloid, kinon, terpenoid, lektör ve polipeptid bileşenlerini içermektedir. Bu immünostimulantların antimikrobiyal özellik gösterip insan ve balık sağlığını tehdit etmeyen zararsız maddeler olduğu bildirilmektedir (Sukumaran vd., 2016; Saeidi asl vd, 2017).

Bu çalışmada Iridaceae familyasına ait antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip geofit bir bitki olan *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* seçilmiştir. Bu bitki çok yıllık, yumrulu bir geofit bitki türüdür. Bitkinin çiçekli dönemi Eylül ve Kasım aylarındadır ve beyaz mavi tonlarında çiçekleri vardır. Yaşam alanını kayalık yamaçlar ile makilikler oluşturur ve 50-2400 m yüksekliklerde bitkiye rastlanabilir. Ülkemizde bu bitkinin ismi ‘çiğdem’ olarak bilinmektedir (Mammadov ve Sahraç, 2003; Deniz, 2016). Iridaceae familyasına ait çeşitli türlerin kullanıldığı farmakolojik çalışmalarda sağlığı olumlu yönde etkileyen biyolojik aktiviteye sahip bileşenleri içerdikleri bildirilmiştir (Singab vd., 2016; Mykhailenko vd., 2019; Zengin vd., 2019). Fitokimyasal incelemeleri sonucu izoflavonlar, flavonlar, flavanonlar, triterpenler, iridallar, ksanonlar, kinonlar, peltojinoidler ve stilbenlerin varlığı tespit edilmiştir (Munyemana, 2013).

Çalışmamızda, Muğla bölgesinde yoğun bir şekilde yetiştiriciliği yapılan Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*, L.1758) balığının spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* (Herbert) Mathew geofit bitki ekstraktının etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Bitki ekstraksiyonun elde edilmesi

*Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* bitkisi Muğla ili Göktepe beldesinde, bitkinin doğal olarak yayılım gösterdiği lokasyonlardan toplanarak identifikasyonu yapılmıştır. Bitkinin soğanları yapraklardan ayrılarak ışık almayan bir oda da kurutulmuştur. Kurutulmuş soğanların kabukları soyulmuş ve distile suda yıkanarak kalıntılardan arındırılmıştır. Bitki soğanları küçük parçalara ayrıldıktan sonra erlenlere konarak üzerine etil alkol ilave edilmiş ve çalkalamalı su banyosunda 50°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra süzülerek sıvı kısım katı parçacıklardan ayrılmıştır (bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır). Daha sonra elde edilen ekstrakta ki etil alkol rotary evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Bitki ekstraktı liyofilize edilerek denemede kullanılmaya kadar buzdolabında +4°C’de saklanmıştır.

### **Balıklar ve deneme dizaynı**

Çalışmada, ortalama  $130 \pm 3,5$  gr ağırlığında 180 adet Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) kullanılmıştır. Deneme Bodrum/Güvercinlik'te bulunan su ürünleri yetiştiriciliği yapan özel bir işletmede yürütülmüştür. Balıklar deneme tanklarına alındıktan sonra iki hafta adaptasyona tabi tutulmuştur. Deneme başlamadan önce rastgele örneklenen balıklar mikrobiyolojik yönden incelenmiş ve herhangi bir enfeksiyon taşımadığı tespit edilmiştir. Deneme 3 gruptan (her bir grupta 30 adet balık) oluşmuştur ve iki paralel olarak dizayn edilmiştir. Bitki ekstraktı iki farklı konsantrasyonda (0,5 mg/balık, 2 mg/balık) hazırlanarak 0,1 ml dozajında intraperitoneal enjeksiyonla balıklara uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise 0,1 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) enjekte edilmiştir.

### **Balıklardan kan alımı**

Enjeksiyon işlemini takiben, belirlenen örnekleme günlerinde (7., 14., 21., 28. ve 35. gün) her bir gruptan 5'er adet balık rastgele seçilmiş ve anestezi (fenoksietanol 0,32 ml/l) uygulanarak kaudal venadan enjektör yardımıyla hematolojik ve immünolojik parametreler için heparinli ve heparinsiz tüplere kan örnekleri alınmıştır. Heparinsiz kan örneklerinden serum elde etmek amacıyla örnekler  $+4^{\circ}$  C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün 3500 devirde 15 dk santrifüj edilerek serum elde edilmiş ve kullanılmaya kadar  $-20^{\circ}$  C'de muhafaza edilmiştir (Stolen vd., 1990).

### **Hematolojik parametreler**

Levrek balıklarına iki farklı konsantrasyonda uygulanan bitki ekstraktının bağışıklık sisteme etkisini belirlemek amacıyla hematolojik parametrelerden toplam lökosit sayısı, monosit, lenfosit ve nötrofil sayıları ile hematokrit değeri tespit edilmiştir. Toplam lökosit hücre miktarı belirlenmesinde Thoma lamında sayım yöntemi kullanılmıştır. Kan örnekleri lökosit sayımı için özel pipete alınmış ve 1/10 oranında Natt-Herrick solüsyonu ile seyreltilmiş ve boyanmıştır. Boyanan renkli lökosit hücreleri mikroskopta sayılmıştır (Siwicki vd., 1994; Başusta, 2005).

Hematokrit değeri ölçülmesinde mikrohematokrit yöntem kullanılmıştır. Her bir balıktan alınan kan örnekleri hematokrit tüpe alınmış ve hematokrit santrifüjde 10500 devirde 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra % hematokrit değeri, santrifüj skalası kullanılarak belirlenmiştir (Başusta, 2005).

Balıklardan alınan kan örnekleriyle hazırlanan frotiler May Grünwald-Giemsa boyama tekniği kullanılarak boyanmıştır. Boyanan preparatlar mikroskop altında immersiyon yağı kullanılarak 100X'de incelenmiştir. Hazırlanan bu frotilerden lökosit hücreleri içerisinde yer alan monosit, lenfosit ve nötrofiller yüzde olarak belirlenmiştir (Stoskopf, 1993).

### **Nötrofillerde oksidatif radikal üretimi-Nitroblue tetrazolium testi**

Nötrofillerde oksidatif radikal üretiminin tespiti için NBT (+) hücre sayısının belirlenmesinde Anderson vd. (1992) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. % 0,2 oranında Nitroblue tetrazolium (Sigma, N-6876) solüsyonu steril %0,9'luk tuzlu su ile taze olarak hazırlanmıştır. Heparinli kan örneklerinden alınan 50 µl kan örneği lamel üzerine konularak nemli ortamda  $25^{\circ}$ C'de 30dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası lamel PBS ile yıkanarak eritrositlerden arındırılmıştır. İnkübasyon sonrası yıkanan lamel, NBT solüsyonu damlatılmış lam üzerine ters kapatılarak tekrar nemli ortamda  $25^{\circ}$ C'de 30dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında NBT (+) hücreler mikroskop altında mavi-mor renge boyanmış olarak görüntülenmiş ve 40X büyütmede sayımları yapılmıştır. Her bir balıktan alınan iki ayrı kan örneğinde sayımlar yapılarak elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

### **Serum total protein**

Serum total protein miktarının belirlenmesinde Bradford yöntemi (Bradford, 1976) bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. 96'lık mikropilaya kuyucuklarına 225 µl Bradford reaktifi ve üzerine test edilecek serumdan 25 µl eklenmiş ve spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart örnek olarak, Bovine serum albumin (BSA) farklı konsantrasyonlarda (0,25mg/ml, 0,50 mg/ml, 1 mg/ml ve 1,40 mg/ml) kullanılmış ve spektrofotometrede absorbans değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerle standart eğri grafiği oluşturulmuş ve deneme örneklerindeki sonuçlar değerlendirilmiştir.

### **Serum lizozim aktivitesi**

Serum lizozim aktivitesi turbidimetrik metotla belirlenmiştir. Liyofilize *Micrococcus lysodeikticus* bakterisi (Sigma M 3770) PBS ile süspansiyon edilmiştir. 96'lık mikropilalara hazırlanan bu süspansiyondan 175 µl ve analiz edilecek serum örneklerinden 25 µl konularak spektrofotometrede

450 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak tavuk yumurtası beyazından elde edilen lizozim (lysozyme chicken egg White, Sigma L 6876) kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda 0,001'lik absorbans değerindeki azalma 1 ünite lizozime eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Demers ve Bayne, 1997).

### İstatiksel analizler

Deneme sonucu elde edilen veriler SPSS 25 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır ve gruplar arasında zamana bağlı farklılığın belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Önem seviyesi  $p < 0.05$ 'dir.

## BULGULAR

### Hematolojik parametreler

Avrupa deniz levreğine 2 farklı dozda (0,5 ve 2 mg/balık) intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle uygulanan *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* bitki ekstraktının bağışıklık sisteme olabilecek etkisi hematokrit değer, toplam lökosit sayısı (Tablo 1) ve yüzde monosit, nötrofil ve lenfosit hücre oranları tespit edilerek belirlenmiştir (Tablo 2).

Toplam lökosit sayısında, bitki ekstraktı uygulanan deneme grupları ile kontrol grubu arasında istatistiki açıdan farklılığın ( $p < 0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Bitki ekstraktının uygulandığı her iki deneme grubunda, kontrol grubuna kıyasla lökosit sayısında tüm örnekleme günlerinde artışın olduğu görülmektedir. Bu artış özellikle 2 mg/balık dozunda uygulanan grupta 0,5 mg/balık grubuna göre daha yüksektir. Lökosit sayısındaki maksimum artış 14. günde 2 mg/balık grubunda tespit edilmiştir.

Kan frotilerinde belirlenen lenfosit, monosit ve nötrofil hücrelerinin yüzde oranlarına ait veriler Tablo 2'de gösterilmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucuna göre lenfosit hücrelerinin yüzdeleri değerlendirildiğinde, her iki deneme grubunda kontrol grubuna kıyasla 7. günde ki düşüş hariç diğer günlerde büyük bir farklılığın olmadığı bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). Nötrofil hücre yüzdesinde, bitki ekstraktı uygulanan deneme gruplarında istatistiki olarak 7. günden itibaren artış olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). En yüksek nötrofil yüzdesi 0,5 mg/balık dozunda bitki ekstraktı uygulanan grupta 21. günde görülmektedir. Monosit hücrelerinin yüzdesi değerlendirildiğinde ise her iki deneme grubunda 21. ve 28. günlerde kontrol grubuna oranla artış olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Özellikle uygulamanın 21. gününde hem 0,5 hem de 2 mg/balık gruplarında monosit yüzdesinin en yüksek değere ulaştığı saptanmıştır.

Hematokrit seviyelerinde deneme grubu ve kontrol grubu balıkları arasında istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0.05$ ) (Tablo 1).

### Nitroblue tetrazolium pozitif hücre sayısı

Bitki ekstraktının uygulandığı deneme gruplarında NBT (+) hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan farklılığın önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Örneklemin yapıldığı tüm günlerde, her iki deneme grubunda da NBT (+) hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği görülmektedir (Tablo 1). Denemede 2 mg/balık grubunun NBT pozitif hücre sayısının 28. ve 35. günlerde 0,5 mg/balık grubuna göre daha yüksek değere ulaştığı saptanmıştır.

### Serum lizozim aktivitesi

Deneme ve kontrol grubu balıklarında, serum lizozim aktivitesi bulguları Şekil 1'de verilmiştir. Bitki ekstraktı uygulanan gruplarda özellikle 14., 21. ve 28. günlerde lizozim aktivitesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Maksimum lizozim aktivitesi 2 mg/balık grubunda 21. günde saptanmıştır ( $p < 0.05$ ).

### Serum total protein

*C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* geofit bitki ekstraktının levrek balıklarına intraperitoneal enjeksiyonu sonrası 1.günden 35. güne kadar alınan kan örneklerine ait serum total protein miktarı bulguları Şekil 2'de verilmiştir. Varyans analiz sonucuna göre kontrol grubu ile bitki ekstraktı uygulanan gruplar arasında istatistiki farklılığın olduğu belirlenmiştir. 0,5 mg/balık grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1., 21. ve 35. günlerde artış gösterirken, 2 mg/balık grubunda ise 1., 14. ve 21. günlerde artış olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastalıklara karşı koruyucu amaçlı doğal bağışıklık sistemini uyarıp harekete geçiren çeşitli bitkisel maddelerin balık yetiştiriciliğinde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Ayrıca balıklar da büyümeyi teşvik etmeleri, iştah arttırmaları, ve antimikrobiyal özelliklere sahip olmaları nedeni ile bitki ekstraktlarının su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımı ilgi gören önemli konular arasında yer almıştır (Abdel-Tawwab vd., 2018).

Yapılan bu çalışmada *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* geofit bitki ekstraktının levrek balıklarının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla iki farklı dozda hazırlanan (0,5 ve 2 mg/balık) geofit bitki ekstraktı balıklara intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle uygulanmıştır.

Farklı bitki türlerinin balıklara uygulanması sonrasında çeşitli hematolojik parametrelerin seviyesindeki artış bu tür bitki immunostimulant olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Moghanlou vd., 2018). Hematolojik parametreler, beslenme, su kalitesi ve hastalık gibi etmenlere bağlı olarak balığın fizyolojisi, bağışıklık sistemi ve dolayısıyla da sağlık durumu hakkında bilgi edinmemizi sağlayan önemli indikatörlerdir (Fazio, 2019). Savunma mekanizmasının ilk hattını oluşturan lökositler doğal bağışıklık sisteminin en önemli hücreleridir. Sağlıklı bireylerde lökosit sayısında ki artış immün sistemin aktive olduğunu göstermektedir (Ngugi vd., 2015; Laith vd., 2017). Saleh vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada levrek balıkları sarımsak (10, 20 ve 30 g/kg diet) ve soğan (5, 10 ve 20 g/kg diet) tozu içeren yem ile 8 hafta beslenmişlerdir. Deneme sonucu toplam lökosit sayısının 30 g/kg oranında sarımsak tozu uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Farklı oranlarda soğan tozu uygulanan tüm deneme gruplarında ise toplam lökosit sayısının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diler vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada gökkuşacağı alabalıklarının dietine pelin otu (*Artemisia vulgaris* L.) bitkisi, toz (%0, %0.1, %0.5, %1, %2) ve etanol ekstraktı (250 ve 1000 mg/kg) olarak ilave edilmiştir ve balıklar 60 gün süresince hazırlanan bu yem ile beslenmiştir. Denemenin 20. gününde yapılan örneklemede lökosit sayısının %2 grubunda kontrol ve diğer deneme gruplarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Denemenin 45. gününde ise gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Başka bir çalışmada ise Nil tilapyasında, *Excoecaria agallocha* yaprağı ekstraktının bağışıklık sisteme ve *Streptococcus agalactia*'ye karşı etkisini belirlemek amacıyla 5 farklı konsantrasyonda diyetle bitki ekstraktı ilave edilmiştir. Balıklar 28 gün bu diyetle beslenmiş ve çalışma sonucu toplam lökosit sayısının 50 mg ekstrakt uygulanmış deneme grubunda 28. günde arttığı bulunmuştur (Laith vd., 2017). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler sonucu *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* geofit bitki ekstraktı verilen deneme gruplarında toplam lökosit hücre sayısında ki artışın yukarıdaki araştırma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. 2 mg/balık dozunda bitki ekstraktı uygulanan grupta toplam lökosit sayısında ki artışın daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda lökosit grubu kan hücrelerinden olan monosit, nötrofil ve lenfosit hücrelerinin yüzde oranları belirlenmiştir. Farklı bitki türleri uygulanan çeşitli balık türlerinde yapılan çalışmalarda monosit, nötrofil ve lenfosit oranlarında artış olduğu bildirilmiştir (Binaii vd., 2014; Saeidi asl vd., 2017; Dias vd., 2019) Enfeksiyon olmadığı halde artan lökosit grubu hücre sayısı bağışıklık sistemin uyarılarak aktive olduğunu gösteren olumlu bir sonuçtur. Lökosit hücre sayısı bulguları incelendiğinde, *C. cancellatus* bitki ekstraktının uygulandığı bu çalışma ile yukarıda belirtilen farklı balık türlerinde uygulanan immunostimulant çalışmalarına ait sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir.

Bitki ekstraktının uygulandığı bu çalışmada kandaki hematokrit seviye belirlenmiştir ve deneme ile kontrol grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). Yılmaz ve Ergün (2012 b) tarafından yapılan bir çalışmada levrek balıklarına sarımsak (0.01 ve 0.02 mL/L) ve zencefil (0.01 ve 0.02 mL/L) yağı ve ikisinin karışımı (herbir yağ için konsantrasyon 0.005 ve 0.01 mL/L) immersiyon yöntemiyle (96 saat) uygulanmıştır. Deneme sonucu hematokrit seviyesinde deneme ve kontrol grubu arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise *Stachys lavandulifolia* Vahl ekstraktı içeren yem ile beslenen alabalıklarda hematokrit değerinde farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Moghanlou vd., 2018). Çalışma bulgularımız ile yukarıda örnek olarak verilen araştırma bulguları benzer sonuçlar göstermiştir. Balıklara uygulanan bitkisel immunostimulantların kan hematokrit seviyesinde olumsuz bir etki yaratmadığı görülmektedir.

Fagositik hücrelerin patojenik mikroorganizmaları öldürebilme yeteneği, vücudun hastalıklara karşı korunmasında görev alan önemli mekanizmalardan biridir. Aktif nötrofil hücrelerinin belirlendiği

NBT (+) hücre sayısındaki artış doğal bağışıklık sisteminin aktive olduğunu gösteren bir parametredir. *C. cancellatus* geofit bitki ekstraktı uygulanan balıklardan haftalık alınan kan örneklerinde NBT (+) hücreler belirlenerek sayılmıştır. Bilen vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada sazan balıkları dere otu (*Anethum graveolens*) ve tere (*Lepidium sativum*) bitkilerinden 1 ve 2 g/kg oranlarında hazırlanmış diet ile 45 gün beslenmişlerdir. Süperoksit anyonlarının üretimini belirlemek amacıyla NBT testi yapılmış ve deneme gruplarında süperoksit anyon üretiminin kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir. Nil tilapularında yapılan başka bir çalışmada balıklar 6 farklı konsantrasyonda tarçın içeren yem ile 8 hafta süresince beslenmiştir. Çalışma sonucuna göre 3 ve 10 g/kg oranlarında tarçın ile beslenen gruplarda NBT (+) hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir (Abdel-Tawwab vd., 2018). Bilen vd. (2013 a) tarafından yapılan başka bir çalışmada koi balıkları 3 farklı dozda (0,5, 1, 1,5 g kg-1) tetra özütü (*Cotinus coggygria*) içeren yem ile 4 hafta beslenmiştir. NBT (+) hücre sayısı tüm deneme gruplarında kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca NBT (+) hücre sayısının tetra dozunun miktarıyla doğru orantılı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda iki farklı dozajda uygulanan geofit bitki ekstraktının uygulandığı gruplarda saptanan NBT (+) hücre sayısındaki artış yukarıda belirtilen çalışmalara ait sonuçlar ile uyumludur. Her iki deneme grubumuzda da NBT (+) hücre sayısı artış göstermiştir, özellikle 2 mg/balık grubu 0,5 mg/balık grubuna kıyasla 28. ve 35. günlerde daha yüksek değerlere ulaşmıştır.

Balıklarda humoral faktörelere biri olan lizozim, mukus, kan serumu, böbrek, karaciğer, dalak ve fagositik hücrelerde bulunan bir enzimdir ve doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Antimikrobiyal özelliğe sahip olan lizozim bakterilerin hücre duvarını inhibe ederek etki gösterir ve balığı patojen mikroorganizmalara karşı korur (Iwama ve Nakanishi, 1996; Kav ve Erganiş, 2008; Uribe vd., 2011). Yapılan birçok çalışmada bitkisel kökenli immunostimulantların lizozim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Örneğin; Yılmaz vd. (2016 a)'nin yaptığı bir çalışmada levrek balıkları %1 oranında kekik (*Thymus vulgaris* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve çemen (*Trigonella foenum graecum* L.) ilave edilen yemler ile 45 gün boyunca beslenmiştir. Lizozim aktivitesinin 30. günden itibaren tüm deneme gruplarında kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği bulunmuştur. Wang vd. (2016) tarafından yapılmış bir çalışmada bitkisel polisakkaritler (*Ficus carica*, *Radix isatidis*, *Schisandra chinensis*) diyete eklenerek sazan balıklarına 21 gün boyunca verilmiştir. Serum lizozim aktivitesinin özellikle yemlemenin 14. gününden sonra kontrol grubuna kıyasla polisakkarit içeren yemle beslenen deneme gruplarında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada alabalıklar %1, %2 ve %3 oranlarında ısırgan otu ilaveli yemle 8 hafta süresince beslenmiştir ve serum lizozim aktivitesinin 8. haftada %2 ve %3 oranında ısırgan otunun kullanıldığı deneme gruplarında kontrol grubuna göre yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur (Saeidi asl vd., 2017). Çipura balıklarında yapılan bir çalışmada, *Muscari comosum* bitki ekstraktı 0,5 ve 2 mg/balık konsantrasyonlarında intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle balıklara uygulanmıştır. Çalışma sonucu en yüksek serum lizozim aktivitesi 7. günde 0,5 mg/balık grubunda ve 21. günde 2 mg/balık grubunda belirlenmiştir (Baba vd., 2014). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki immunostimulantlar bağışık cevabı aktive ederek lizozim seviyesinde artışa sebep olmaktadır. Yukarıda bahsedilen araştırmalar ile çalışma sonuçlarımız benzerlik göstermektedir ve *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* geofit bitki ekstraktının her iki dozda da 14., 21. ve 28. günlerde lizozim seviyesinde kontrol grubuna oranla belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Serum total protein humoral kompenetlerden olan albümin, globülin, lipoprotein ve glikoproteinler gibi çeşitli proteinlerden oluşmaktadır ve balıklarda doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Serum total protein miktarı balığın türüne, yaşına ve yaşadığı su koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir (Baba, 2014). Asya deniz levreğinde yapılan bir çalışmada zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe), balıkların yemine 1, 2, 3, 5 ve 10 g/kg oranlarında karıştırılmıştır ve 15 gün boyunca beslenmişlerdir. Deneme sonucu 3, 5 ve 10 g/kg zencefil ile beslenen gruplarda toplam protein miktarının kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği tespit edilmiştir (Talpur vd., 2013). Bir başka çalışmada, kahverengi hazar alabalıkları %1, %2, %3 oranlarında nane ekstraktı içeren yemle 8 hafta boyunca beslenmiştir ve serum total protein miktarının özellikle %3'lük nane konsantrasyonu ile beslenen grupta deneme grubuna kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir (Adel vd., 2015). Çalışma bulgularımız incelendiğinde farklı balık türlerinde, farklı bitkisel uygulamaların yapıldığı yukarıda bahsedilen araştırma bulguları ile benzer sonuçlara sahip olduğu görülmektedir ve serum total protein miktarında deneme gruplarında kontrol grubuna kıyasla artış kaydedilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* bitki ekstraktı levreklerde doğal bağışıklık sistemini harekete geçirmekte ve bazı immün sistem parametrelerinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 2 mg/balık dozunun, bağışık cevapta önemli bir rol oynayan toplam lökosit hücre sayısında ve NBT pozitif hücre sayısında 0,5 mg/balık dozuna göre daha etkili olduğu ve deniz balıkları yetiştiriciliğinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Hastalıklara karşı korunmada alınabilecek önlemler arasında diyetlere immunositimulant ilave edilmesi yetiştiricilik açısından uygulanması gereken alternatif ve faydalı yöntemlerden biridir. Ekonomik, etkin ve uygulanabilir olması sebebiyle büyük bir avantaja sahiptir. Sürdürülebilir bir yetiştiricilik için, doğal ve çevre dostu bitkisel kökenli immunostimulant uygulamalarının geliştirilmesine devam edilerek, farklı balık türlerinde, farklı yetiştiricilik koşullarında bilimsel çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Tablo 1.** Farklı dozlarda *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* ekstraktı uygulanan levreklerde hematokrit (%), NBT (+) hücre sayısı ve toplam lökosit hücre sayısı sonuçları

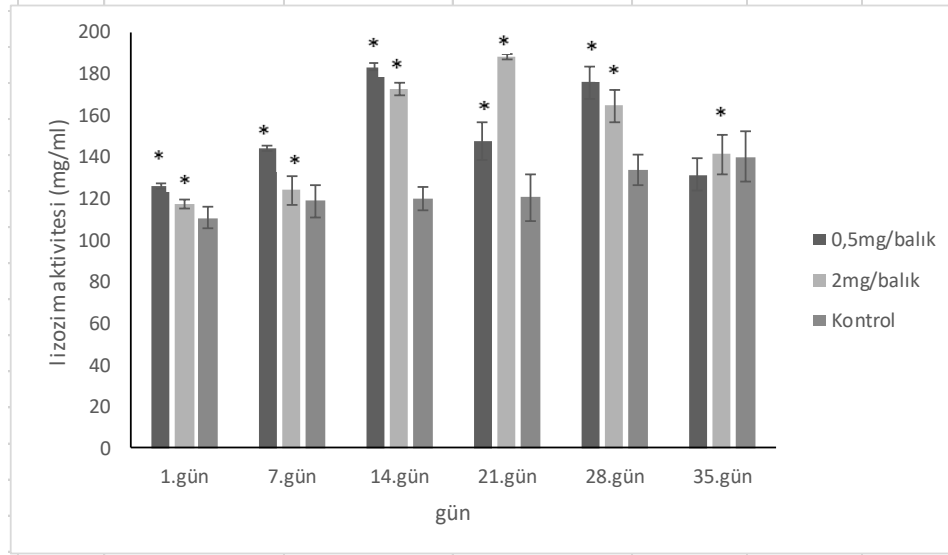
	Grup	Hematokrit (%)	NBT (+) hücre sayısı	Toplam lökosit ( $10^3$ cell/mm <sup>3</sup> )
7.gün	0,5 mg	36 ± 0,47 <sup>a</sup>	6 ± 0,52 <sup>a</sup>	60,30 ± 2,07 <sup>de</sup>
	2 mg	36 ± 0,29 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,19 <sup>bc</sup>	67,34 ± 2,44 <sup>bc</sup>
	Kontrol	36 ± 0,47 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,19 <sup>hi</sup>	54,68 ± 0,96 <sup>ef</sup>
14.gün	0,5 mg	35,6 ± 0,28 <sup>a</sup>	6 ± 0,21 <sup>a</sup>	62,22 ± 0,49 <sup>cd</sup>
	2 mg	36 ± 0,47 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,53 <sup>a</sup>	82,96 ± 2,42 <sup>a</sup>
	Kontrol	36,3 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,24 <sup>efghi</sup>	50,15 ± 2,08 <sup>fg</sup>
21.gün	0,5 mg	35,6 ± 0,33 <sup>a</sup>	6 ± 0,62 <sup>a</sup>	80,46 ± 3,46 <sup>a</sup>
	2 mg	36 ± 0,69 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,54 <sup>a</sup>	82,37 ± 1,77 <sup>a</sup>
	Kontrol	36,4 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,22 <sup>defg</sup>	46,09 ± 1,58 <sup>gh</sup>
28.gün	0,5 mg	35,7 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,22 <sup>cd</sup>	70,64 ± 1,29 <sup>b</sup>
	2 mg	36,2 ± 0,13 <sup>a</sup>	4 ± 0,72 <sup>b</sup>	68,32 ± 2,25 <sup>b</sup>
	Kontrol	36 ± 0,76 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,20 <sup>efghi</sup>	50,80 ± 0,37 <sup>fg</sup>
35.gün	0,5 mg	36,1 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,16 <sup>defgh</sup>	60,46 ± 1,92 <sup>de</sup>
	2 mg	36,2 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,30 <sup>def</sup>	65,68 ± 1,96 <sup>bcd</sup>
	Kontrol	36 ± 0,21 <sup>a</sup>	1 ± 0,18 <sup>ghi</sup>	50,00 ± 1,05 <sup>fg</sup>

Tablodaki harflendirmeler istatistiki farklılıkları göstermektedir (p > 0,05; n:30)

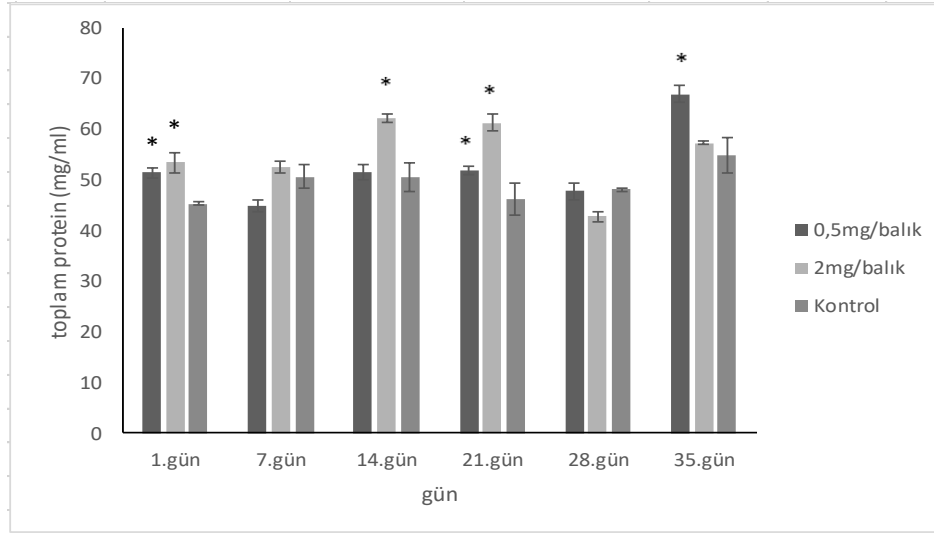
**Tablo 2.** Farklı dozlarda *Crocus cancellatus* subsp. *mazziaricus* ekstraktı uygulanan levreklerde kan frotisinde sayılan lenfosit, nötrofil ve monosit hücrelerin yüzde oranları

	Grup	Lenfosit (%)	Nötrofil (%)	Monosit (%)
7. gün	0,5 mg	83,8 ± 1,42 <sup>f</sup>	6,2 ± 0,51 <sup>b</sup>	8 ± 1,31 <sup>a</sup>
	2 mg	89 ± 1,38 <sup>e</sup>	5 ± 0,13 <sup>c</sup>	6 ± 1,32 <sup>c</sup>
	Kontrol	94,6 ± 0,33 <sup>cd</sup>	2,4 ± 0,26 <sup>ef</sup>	3 ± 0,24 <sup>e</sup>
14.gün	0,5 mg	95,6 ± 0,33 <sup>c</sup>	2,2 ± 0,33 <sup>ef</sup>	2,2 ± 0,21 <sup>f</sup>
	2 mg	94,8 ± 0,32 <sup>cd</sup>	3 ± 0,13 <sup>d</sup>	2,2 ± 0,21 <sup>f</sup>
	Kontrol	94,8 ± 0,77 <sup>cd</sup>	2,1 ± 0,32 <sup>ef</sup>	3,1 ± 0,61 <sup>e</sup>
21.gün	0,5 mg	82,8 ± 0,53 <sup>f</sup>	7,2 ± 0,74 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,93 <sup>b</sup>
	2 mg	92,8 ± 0,57 <sup>d</sup>	3,2 ± 0,32 <sup>d</sup>	4 ± 0,47 <sup>d</sup>
	Kontrol	96,4 ± 0,54 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,42 <sup>g</sup>	2 ± 0,16 <sup>f</sup>
28.gün	0,5 mg	96 ± 0,21 <sup>b</sup>	2 ± 0,29 <sup>ef</sup>	2 ± 0,21 <sup>f</sup>
	2 mg	96,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,29 <sup>g</sup>	2 ± 0,16 <sup>f</sup>
	Kontrol	97,2 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,13 <sup>g</sup>	1 ± 0,16 <sup>g</sup>
35.gün	0,5 mg	96,8 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,13 <sup>g</sup>	2 ± 0 <sup>f</sup>
	2 mg	95 ± 0,55 <sup>c</sup>	3 ± 0,44 <sup>d</sup>	2 ± 0,24 <sup>f</sup>
	Kontrol	95,4 ± 0,33 <sup>c</sup>	2,6 ± 0,21 <sup>e</sup>	2 ± 0,13 <sup>f</sup>

Tablodaki harflendirmeler istatistiki farklılıkları göstermektedir (p > 0,05; n:30)



**Şekil 1.** Gruplar arasında serum lizozim aktivitesi değişimleri ( $p > 0,05$ ;  $n:30$ )  
\*: İstatistiki açıdan farklılığı göstermektedir.



**Şekil 2.** Gruplar arasında serum total protein miktarlarındaki değişim ( $p > 0,05$ ;  $n:30$ ),  
\*: İstatistiki açıdan farklılığı göstermektedir.

**Teşekkür:** Bu çalışma, TUBİTAK 104V126 no'lu kariyer projesinin bir parçası olup Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi BAP tarafından da 09/19 nolu yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

- Abdel-Tawwab, M., Samir, F., Abd El-Naby, A.S., & Monier, M.N. (2018). Antioxidative and immunostimulatory effect of dietary cinnamon nanoparticles on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and its susceptibility to hypoxia stress and *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 74, 19-25.
- Adel, M., Safari, R., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Esteban, M.Á. (2015). Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish and Shellfish Immunology*, 47, 623-629.
- Akşit, D. (2016). Balık Yetiştiriciliğinde Antibakteriyel Direnç ve Önemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 2 (1), 47-54.
- Anderson, D.P., Moritomo, T., & Grooth, R. (1992). Neutrophile, glass adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30 (4), 419-429.



- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 40–54.
- Baba, E., Uluköy, G., & Mammadov, R. (2014). Effects of *Muscari comosum* extract on nonspecific immune parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1758). *Journal of the World Aquaculture Society*, 45 (2), 173–182.
- Baba, E. (2014). *Gökkuşluğu Alabalığı (Oncorhynchus mykiss, Walbaum 1792)'nda bazı mantar türlerinin spesifik olmayan immün sistem üzerine etkilerinin araştırılması*. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Muğla, 177 s.
- Başusta, A.G. (2005). *Balık Hematolojisi ve Hematolojik Metotlar*. Nobel Yayın, Ankara.
- Beltrán, J.M.G., Espinosa, C., Guardiola, F.A., & Esteban, M.Á. (2018). In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 79, 1–10.
- Bilen, S., Yılmaz, S., & Bilen, A. M. (2013). Tetra (*Cotinus coggygria*) özütünün koi balıklarında (*Cyprinus carpio*) *Vibrio anguillarum* enfeksiyonuna karşı hematolojik ve immunolojik açıdan etkileri. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13 (3), 517–522.
- Bilen, S., Özkan, O., Alagöz, K., & Özdemir, K.Y. (2018). Effect Of dill (*Anethum graveolens*) and garden cress (*Lepidium sativum*) dietary supplementation on growth performance, digestive enzyme activities and immune responses of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 495, 611-616.
- Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S. M. V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi, S.E., Taghavi, M.J., & Bankehsaz, Z. (2014). Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36 (1), 46–51.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Candan, A., & Karataş, S. (2010). *Balık Sağlığı*. Kalmak Ofset, İstanbul.
- Demers, N.E., & Bayne, C.J. (1997). The immediate effects of stres on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, 21, 363- 373.
- Deniz, N. (2016). *Crocus cancellatus subsp. mazziaricus ve Crocus pallasii subsp. pallasii taksonlarının ekstraktlarının aktif bileşenleri ve bazı biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi*. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli, 66 s.
- Dias, M.K.R., Yoshioka, E.T.O., Rodriguez, A.F.R., Ribeiro, R.A., Faria, F.S.E.D.V., Ozório, R.O.A., & Tavares-Dias, M. (2019). Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets. *Fish and Shellfish Immunology*, 84, 843–847.
- Diler, Ö., Görmez, Ö., Terzioğlu, S., & Atabay, A. (2018). Effect of wormwood (*Artemisia vulgaris* L) on resistance against diseases and nonspecific immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 4 (1), 1–11.
- Done, H.Y., & Halden, R.U. (2015). Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. *Journal of Hazardous Materials*, 282, 10–17.
- Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture*, 500, 237–242.
- Hai, N.V. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 446, 88–96.
- Iwama, G., & Nakanishi, T. (1996) *The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment*, Academic Press. California, USD.
- Kav, K., & Erganiş, O. (2008). Balıklarda Bağışıklık Sistemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1, 97-106.
- Laith, A.A., Mazlan, A.G., Effendy, A.W., Ambak, M.A., Nurhafizah, W.W.I., Alia, A.S., Jabar, A., & Najiah, M. (2017). Effect of *Excoecaria agallocha* on non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus agalactiae*. *Research in Veterinary Science*, 112, 192–200.
- Lundén, T., Miettinen, S., Lönnström, L.G., Lilius, E.M., & Bylund, G. (1998). Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 8 (3), 217–230.
- Mammadov, R., & Sahraç, B. (2003). Muğla İl Merkezinde Sonbaharda Tespit Edilen Bazı Geofitler. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12, 13-18.
- Moghanlou, K.S., Isfahani, E.N, Dorafshan, S., Tukmechi, A., & Aramli, M.S. (2018). Effects of dietary supplementation with *Stachys lavandulifolia* Vahl extract on growth performance, hemato-biochemical and innate immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 237, 98–105.
- Munyemana, F. (2013). Qualitative Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity Evaluation of the Bulb

- Extracts of *Gladiolus psittacinus* Hook (Iridaceae). *International Network Environmental Management Conflicts*, 2 (1), 14-31.
- Mykhailenko, O., Kovalyov, V., Goryacha, O., Ivanauskas, L., & Georgiyants, V. (2019). Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry*, 162, 56-89.
- Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Mugo-Bundi, J., Orina, P.S., Chemoiwa, E.J., & Aloo, P. A. (2015). biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult *Labeo victorianus* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44 (2), 533-541.
- Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Londero, É. P., Bressan, C. A., Ourique, G. M., Rizzetti, T. M., Prestes, O.D., Zanella, R., Baldisserotto, B., & Pavanato, M. A. (2018). Protective effect of quercetin against oxidative stress induced by oxytetracycline in muscle of silver catfish. *Aquaculture*, 484, 120-125.
- Ren, X., Pan, L., & Wang, L. (2014). Effect of florfenicol on selected parameters of immune and antioxidant systems and damage indexes of juvenile *Litopenaeus vannamei* following oral administration. *Aquaculture*, 432, 106-113.
- Rico, A., Phu, T.M., Satapornvanit, K., Min, J., Shahabuddin, A.M., Henriksson, P.J.G, Murray, F.J., Little, D.C., Dalsgaard, A., & Brink, P.J.V (2013) Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412-413, 231-243.
- Saeidi asl, M.R., Adel, M., Caipang, C.M.A., & Dawood, M.A.O. (2017). Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 71, 230-238.
- Saleh, N. E., Michael, F. R., & Toutou, M. M. (2015). Evaluation of garlic and onion powder as phyto-additives in the diet of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41 (2), 211-217.
- Singab, A.N.B., Ayoub, I.M., El-Shazly, M., Korinek, M., Wu, T.Y., Cheng, Y.Bin, Chang., F.R., & Wu, Y.C. (2016). Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 92, 308-335.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., & Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139.
- Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson B.S., & van Muiswinkel W.B. (1990). *Techniques in Fish Immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications
- Stoskopf M. K. (1993). *Fish Medicine*. Philadelphia: WB Saunders.
- Sukumaran, V., Parh, S.C., & Sankar, S. (2016). Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*, 57, 362-370.
- Talpur, A. D., Ikhwanuddin, M., & Ambok Bolong, A. M. (2013). Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 400-401, 46-52.
- Terech-Majewska, E. (2016). Improving disease prevention and treatment in controlled fish culture. *Archives of Polish Fisheries*, 24, 115-165.
- TUİK, Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri. Alıntılanma Adresi [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1005](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005) (03.09.2019).
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56 (10), 486-503.
- Wang, E., Chen, X., Wang, K., Wang, J., Chen, D., Geng, Y., Lai, W., & Wei, X. (2016). Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 59, 196-202.
- Yılmaz, S., Ergün, S., & Çelik, E. Ş. (2016 a). Effect of Dietary Spice Supplementations on Welfare Status of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences India, Section B, Biological Sciences*, 86 (1), 229-237.
- Yılmaz, S., & Ergün, S. (2012 b). Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24 (4), 219-224.
- Zengin, G., Aumeeruddy, M. Z., Diuzheva, A., Jekö, J., Cziáky, Z., Yıldıztuğay, A., Yıldıztuğay, E., & Mahomoodally, M. F. (2019). A comprehensive appraisal on *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. flower extracts with HPLC-MS/MS profiles, antioxidant and enzyme inhibitory properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 581-589.