T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI

ÜRYANİ ERİĞİ (*Prunus domestica*) EKSTRAKTININ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) KIZILAĞIZ HASTALIĞINA (*Yersinia ruckeri*) KARŞI BAĞIŞIKLIK YANITI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

BÜNYAMİN KÜÇÜKKÖŞKER

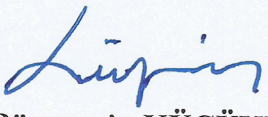
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOÇ. DR. ERTUĞRUL TERZİ

MAYIS - 2020
KASTAMONU

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.



Bünyamin KÜÇÜKKÖŞKER

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜRYANİ ERİĞİ (*Prunus domestica*) EKSTRAKTININ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) KIZILAĞIZ HASTALIĞINA (*Yersinia ruckeri*) KARŞI BAĞIŞIKLIK YANITI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

BÜNYAMİN KÜÇÜKKÖŞKER

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN: DOÇ. DR. ERTUĞRUL TERZİ

Bu çalışmada üryani eriği (*Prunus domestica*) sulu metanolik özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansında ve bağışıklık yanıtlarındaki değişimler incelenmiş ve ayrıca enterik kızılağız hastalığına (*Yersinia ruckeri*) karşı koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla balıklar %0 (Kontrol), %0,1, %0,5 ve %1 dozlarında üryani eriği özütü içeren yemlerle doyana kadar günde iki kere beslenmişlerdir. Çalışmanın 7, 14 ve 21. günlerinde balıklardan kan ve doku (dalak, bağırsak ve ön böbrek) örnekleri alınarak balıkların bağışıklık ve sitokin gen yanıtlarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Çalışma sonunda balıklara intraperitonal olarak *Yersinia ruckeri* enjekte edilerek 10 gün boyunca balıkların yaşama oranları kaydedilmiştir. Balıkların oksidatif radikal üretimlerinde 7. günde %1 grubunda artış gözlenirken ($P<0,05$), diğer örnekleme dönemlerinde bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$). Bakteri öldürme aktivitesinin ise yine benzer şekilde %1 grubunda önemli derecede arttığı tespit edilmiş olup, çalışmanın 21. gününde ise yine bu grupta düşüş gözlenmiştir ($P<0,05$). Lizozim aktivitelerinde hiçbir örnekleme döneminde değişiklik görülmezken ($P>0,05$), 14. günde myeloperoksidaz aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla deneme gruplarında artışı söz konusudur ($P<0,05$). Çalışmanın 7. gününde sitokin gen ekspresyonlarında bağırsak ve böbrekte artış görülmüştür. Yem Dönüştürme Oranında %1 lik grupta düşüş görülmüştür. Üryani eriği ekstraktı ile beslenen balıkların dokularında histopatolojik olarak herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Tüm deneme gruplarının *Yersinia ruckeri*'ye karşı hayatta kalma oranı kontrol grubuna göre daha yüksek yaşama oranına sahip olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Tüm bu sonuçlar ışığında üryani eriğinin immunostimulant olarak gökkuşağı alabalıklarında *Yersinia ruckeri*'ye karşı kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Alabalık, üryani eriği, bağışıklık yanıtı, *Yersinia ruckeri*

Mayıs 2020, Sayfa, 52
Bilim Dalı:1207

ABSTRACT

MSC THESIS

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF THIN-SKINNED PLUM (*Prunus domestica*) EXTRACT ON IMMUNE RESPONSE OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) AGAINST ENTERIC REDMOUTH DISEASE (*Yersinia ruckeri*)

BÜNYAMİN KÜÇÜKKÖŞKER

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF AQUACULTURE
SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ERTUĞRUL TERZİ

In this study, changes in immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with thin-skinned plum (*Prunus domestica*) aqueous methanolic extract and also its protective efficacy against enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*) were investigated. For this purpose, the fish were fed diet containing thin-skinned plum extract doses of 0% (Control), 0.1%, 0.5% and 1% *ad libitum* twice in a day. Blood and tissue (spleen, intestine and anterior kidney) samples were taken from the fish 7, 14, and 21. days of the study and changes in immune and cytokine gene responses of fish were determined. *Yersinia ruckeri* was intraperitoneally injected at the end of the study and the survival rate of the fish was recorded for 10 days. While there was an increase in the oxidative radical release of the fish in the 1% group on the 7th day ($P < 0.05$), no difference was observed in the other sampling periods ($P > 0.05$). Bacterial killing activity was also found to increase significantly in the 1% group ($P < 0.05$) and on the 21. day of the study, this group showed a decrease ($P < 0.05$). While lysozyme activities did not change during any sampling period ($P > 0.05$), myeloperoxidase activity increased in all groups on day 14 compared to control group ($P < 0.05$). Cytokine gene expression elevated on the 7^{th} day of the study in the kidney and intestine. Feed conversion ratio was significantly decreased on the 1% group. It was not observed any histopathologically adverse effects on the fish fed with thin-skined plum extract. All experimental group's challenge results showed an increased survival rate against *Yersinia ruckeri* ($P < 0.05$). In the light of all these results, it was concluded that thin-skinned plum can be used as immunostimulant in rainbow trout against *Yersinia ruckeri*.

KEYWORDS: Trout, Thin-skinned plum, immune response, *Yersinia ruckeri*

May 2020, Page, 52
Science Code:1207

TEŞEKKÜR

Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada; Kastamonu Bölgesinde bol bulunan ve üretilen üryani eriğinin gökkuşağı alabalıklarında yersiniozis (enterik kızılağız) hastalığına karşı bağışıklık yanıtı üzerine etkilerinin belirlenmesi araştırılmıştır.

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların yürütülmesinde ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde öneri ve paylaşımlarıyla desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Ertuğrul TERZİ'ye şükranlarımı sunarım.

Deneysel ve laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Soner BİLEN'e, hem laboratuvar hem de tez yazım aşamalarındaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Osman Nezih KENANOĞLU ve Dr. Nihan AKINCI'ya teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve becerilerini benden esirgemeyen Kastamonu Üniversitesi akademik personeline ayrıca teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında üzerimde desteklerini hissettiğim sevgili aileme teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından KÜ-BAP01/2018-25 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BÜNYAMİN KÜÇÜKKÖŞKER

Kastamonu, 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Balıklarda Bağışıklık Sistemi 2
1.2 Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) 4
1.3 Yersiniozis (Enterik Kızılağız Hastalığı) 5
1.4 Balıklarda Büyüme Performansı ve Besin Kullanımı 6
1.5 Bitkisel Kaynakların Kullanılması 6
1.6 Üryani Eriği 7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR **8**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **12**
3.1 Materyal 12
3.1.1 Deneme Balıkları 12
3.1.2 Deneme Yeri ve Deney Sistemi 12
3.2 Yöntem 12
3.2.1 Üryani Eriği Sulu Metanolik Ekstraktının Hazırlanması 12
3.2.2 Araştırma Yemleri ve Yemleme Programının Düzenlenmesi 14
3.2.3 Balıklardan Kan ve Doku Örneklerinin Alınması 15
3.2.4 Bağışıklık Yanıtların Belirlenmesi 15
3.2.4.1 Oksidatif radikal üretimi 15
3.2.4.2 Bakteriyel öldürme aktivitesi 16
3.2.4.3 Lizozim aktivitesi 16
3.2.4.4 Myeloperoksidaz aktivitesi 16
3.2.4.5 Gen ekspresyonu 17
3.2.4.6 Toplam RNA izolasyonu 17
3.2.4.7 Komplementer DNA (cDNA) sentezi 17
3.2.4.8 Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi 18
3.2.5 Büyüme Performansı 18
3.2.6 Histopatoloji 19
3.2.7 Kontrol Testi 20
3.2.8 İstatistiksel Analizler 20
4. BULGULAR **21**
4.1 Büyüme Performansında Meydana Gelen Değişimler 21
4.2 İmmünolojik Bulgular 21
4.2.1 Oksidatif Radikal Üretimi 21
4.2.2 Bakteriyel Öldürme Aktivitesi 22
4.2.3 Lizozim Aktivitesi 23

4.2.4 Myeloperoksidaz Aktivitesi 24
4.2.5 Gen Sunumları 25
4.2.5.1 IL-1β 25
4.2.5.2 IL-6 27
4.2.5.3 IL-8 28
4.2.5.4 IL-10 29
4.2.5.5 IL-12 31
4.3 Histopatoloji Bulguları 32
4.4 Kontrol Testi 35
5. TARTIŞMA 36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 42
7. KAYNAKLAR 43
8. ÖZGEÇMİŞ 53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Balıklarda spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi. 3
Şekil 1.2 Gökkuşağı alabalığında kızılağız hastalığının klinik belirtileri. 6
Şekil 1.3 Üryani eriği (*Prunus domestica*)..... 7
Şekil 3.1 Sulu metanolik karışımının evaporatörde uçurulması (Özgün). 13
Şekil 4.1 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının oksidatif radikal üretimlerinde meydana gelen değişimler (mg/ml) 22
Şekil 4.2 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bakteriyel öldürme aktivitelerinde meydana gelen değişimler. 23
Şekil 4.3 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının lizozim aktivitelerinde meydana gelen değişimler. 24
Şekil 4.4 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının myeloperoksidaz aktivitesinde meydana gelen değişimler. 25
Şekil 4.5 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-1β geninin ekspresyon seviyeleri. IL-6 26
Şekil 4.6 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-6 geninin ekspresyon seviyeleri. 28
Şekil 4.7 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-8 geninin ekspresyon seviyeleri. 29
Şekil 4.8 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-10 geninin ekspresyon seviyeleri. 30
Şekil 4.9 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-12 geninin ekspresyon seviyeleri. 32
Şekil 4.10 Dalak, karaciğer, solungaç ve böbrek kesitlerinin histomorfolojik görünümü. 33
Şekil 4.11 Dalak, karaciğer, solungaç ve böbrek kesitlerinin histomorfolojik görünümü. 34
Şekil 4.12 Deneme sonunda *Yersinia ruckeri* enjekte edilen balıklarda hayatta kalma oranları. 35

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1 Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği miktarları (TÜİK, 2019). 5
Tablo 3.1 Üryani eriği özütünde GC-MS ile belirlenen bileşenler. 14
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan primerler. 18
Tablo 4.1 Üryani eriği ekstraktı ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının büyüme performansı. 21

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	**:** Yüzde
°	**:** Derece
µg	**:** Mikrogram
µl	**:** Mikrolitre
dk	**:** Dakika
g	**:** Gram
kg	**:** Kilogram
l	**:** Litre
mg	**:** Miligram
ml	**:** Mililitre
U	**:** Ünite

Kısaltmalar

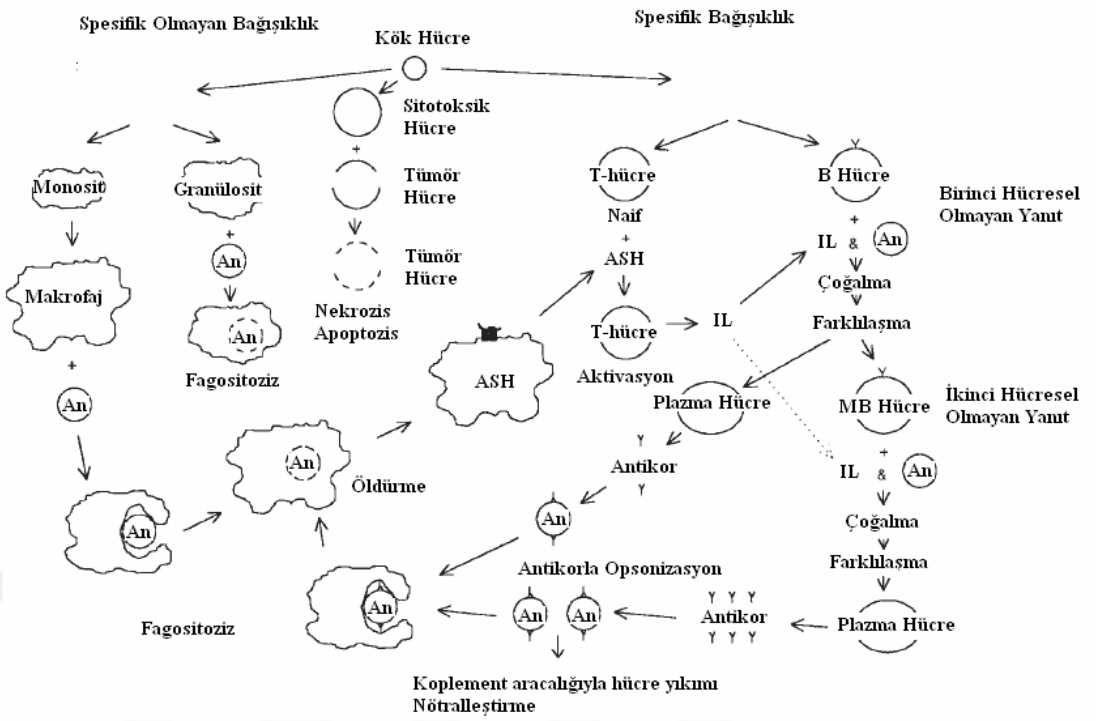
cDNA	**:** Komplementer DNA
DMSO	**:** Dimetil sülfoksit
DNA	**:** Deoksiribonükleik asit
RNA	**:** Ribonükleik asit
H_2O_2	**:** Hidrojen peroksit
IL	**:** İnterlökin
LYS	**:** Lizozim
MPO	**:** Myeloperoksidaz
NBT	**:** Nitro blue tetrazolium chloride
ORÜ	**:** Oksidatif radikal üretimi

1. GİRİŞ

Dünya genelinde balık ve kabuklu ürünlerin yoğun talep görmesi su ürünleri yetiştiriciliğinin hızlı artışını sağlamaktadır (Olsen ve Hasan, 2012). Gelişen su ürünleri üretim teknolojisi ile birlikte balık üretimi de giderek artmakta ve buna bağlı olarak hastalıklara karşı koruyucu önlemlerin alınması daha da önem kazanmaktadır. Özellikle balıkların nakli, aşılanması veya çevresel etkilerden meydana gelebilecek stresin üretim ayağında önemli zorluklar oluşturduğu bilinmektedir. Farklı dönemlerde balıkların maruz kalabileceği bu etmenler bakteriyel hastalıkların yaygın olarak görülmesine neden olabilmektedir. Yetiştirilen balık sayısının artışı, hastalık oluşma ve yayılma riskini daha da yükseltecek olup, fazla miktarda kimyasal (antibiyotik, organofosfat vb.) girişine ihtiyaç duyuracaktır. Bununla birlikte eklenen bu tür kimyasallar balıklar dokularında kalıntı problemlerine ve bakterilerde antibiyotik direncine neden olmaktadır (Boran vd., 2013; Akkan vd., 2015; Capkin vd., 2015; Terzi, 2018; Terzi vd., 2020). Bazı yürütülen çalışmalarda da antibiyotiklerin balıklardaki kalıntısından başka sucul ortamlarda da aylarca etkisini sürdürdüğü rapor edilmiştir. (Pouliquen ve Le Bris, 1996; Hirsch vd., 1999). Su ürünlerinde salgınların önlenmesinde en etkili yöntem olarak bilinen aşılar ise, yaygın olarak kullanım için oldukça pahalı olup, genellikle sadece bir patojene karşı etkili olabilmektedirler (Pasnik vd., 2005). Bu nedenle enfeksiyonlara karşı balık bağışıklığını arttırabilecek ve sağlıklı bir üretim sağlayabilecek alternatif çözümler uygulanmalıdır (Ashley, 2007; Davis vd., 2002). Balık sağlığını korumada immunostimulantların kullanılması alternatif seçenek oluşturabilmekte olup, tıbbi bitkiler de bu anlamda geniş çalışma alanı bulmaktadır (Çek vd., 2007; Keser ve Bilal, 2008; Sönmez vd., 2015). Çevre açısından güvenli olması ve maliyet bakımından uygun olmasıyla avantaj yaratan tıbbi bitkilerin immunostimulant olarak kullanımı, organik balık yetiştiriciliğinin gündeme gelmesiyle de önem kazanmıştır. Bitkisel immunostimulantların antimikrobiyal aktivite göstermesi, gelişmeyi kolaylaştırması ve büyüme performansına olan etkisinin yanında anti-stres özelliği ile su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım alanının olduğu bilinmektedir (Bilen vd., 2018).

1.1 Balıklarda Bağışıklık Sistemi

Balıkların bağışıklık sistemi, doğuştan gelen (spesifik olmayan) ve kazanılmış (spesifik bağışıklık) olmak üzere iki ana alt grupta sınıflandırılmnaktadır (Tort vd., 2003). Mikropları tanıyarak tepki veren doğal bağışıklığın bütün mekanizmaları enfeksiyona yol açmayan yabancı maddelere tepkisiz kalırlar (Arda vd., 2002). Doğal bağışıklık yanıt mekanizmaları mikrop tiplerini tanırken, kazanılmış bağışıklığın hücreleri (lenfositler) mikropların ürettiği değişik maddeleri ve enfeksiyona yol açmayan molekülleri de tanıyan reseptörler taşırlar (Abbas ve Lichtman, 2007). Kazanılmış bağışıklık (Şekil 1.1) belirli bir antijeni özel olarak tanıyan spesifik lenfositlerin uyarılması ve aktive olmasıyla ortaya çıkmaktadır (Diker, 2005). Balıklarda bağışıklık temel olarak omurgalılarla benzer yapıda olsa da sıcaklığa bağlı değişken yapıda olmasından kaynaklı bağışıklık yanıtta farklılıklar meydana gelebilmektedir (Kav ve Erganis, 2008). Balıklarda bölgesel bağışıklık mekanizmasını oluşturan mukus ve epidermis birincil savunma unsurları olup hasar görebilmesi durumunda dokulara patojenler kolayca ulaşabilmekte ve sistemik bağışıklık yanıt devreye girebilmektedir. Bu yanıtlardan kurtulabilen patojenlerin dokulara ulaşması neticesinde, genellikle zayıf olan balıklar enfekte olabilmektedir. Deri, solungaç ve bağırsak balıkların bağışıklık sistemi ile ilişkili mukus yapılı dokulardır. Özellikle deri, mukus salgısı sayesinde birincil fiziksel ve kimyasal savunma hattı olarak kabul görmektedir. İkincil savunma mekanizması ise glikoproteinler, proteoglikanlar ve proteinlerden oluşan, çevre ile balık arasında bir ara yüzey oluşturan tabakadır (Dalmo vd., 1997).



Şekil 1.1 Balıklarda spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi.

An: Antijen, ASH: Antijen sunan hücreler, IL: Interlökin (Noguchi, 1998).

Balıklar daha yüksek omurgalılardaki gibi hücresel ve humoral bağışıklık yanıtlar göstermektedir. Kortikosteroid ve diğer hormonların salgılanmasını gerçekleştirerek endokrin organ görevi gören ön böbrek, immunoglobülin melanomakrofaj merkezleri sentezi aracılığıyla bağışıklık hafızaya yardımcı olmaktadır. Ayrıca ön böbreğin fagositoz ve antijen yapımında da rol aldığı bilinmektedir (Brattgjerd ve Evensen, 1996).

Ön böbreğe kıyasla doğal ve spesifik bağışıklık savunma mekanizmalarında ikincil organı olarak göre yapan dalak, kan hücreleri, endotel hücreleri, retiküler hücreler, makrofajlar ve melanomakrofajlardan oluşmaktadır. Timus ise T-lenfosit üreten ve B hücrelerinin yapımında rol alan antikorların üretimini gerçekleştiren bağışıklık organdır (Zapata ve Amemiya, 2000). Bağışıklık yanıt sisteminde önemli bir rolü olmayan karaciğerin ise retiküloendotelyal sistemin bir parçası olan bazı akut faz reaktanlarını ürettiği belirtilmektedir (Dalmo vd., 1997). Solungaçlar makrofaj, nötrofil, lenfosit ve mast hücreleri ile eozinofilik granülositleri barındıran lenfoid dokularla ilişkili mukus sayesinde bağışıklık sistemin bir parçası olarak rol

oynamaktadır (Pratap ve Wendelaar Bonga, 1993). Gastrointestinal sistem balıkların hem sindirimde hem de bağışıklık sisteminde görev olan bir organ olup, kemikli balıklarda bağırsak ile alakalı lenfoid sistem vücut içerisinde daha yaygın bir etki göstermektedir (Rombout vd., 2011). Lenfosit, plazma hücreleri, eozinofilik hücreler, granülositler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri bakımından zengin olan bağırsak mukozası bölgesel bağışık yanıtları göstermektedir (Press ve Evensen, 1999). Bakteri ve parazitlere karşı bağışıklık yanıt oluşturan eozinofilik granülositler yine bağırsak ve solungaçların mukozal bölgesinde bulunmakta olup spesifik olmayan sitotoksik hücreler ise kan, lenfoid doku ve mukozal bölgelerde bulunmaktadır (Secombes, 1996). Spesifik olmayan yanıtın humoral bileşenleri, mikroorganizmaların adhezyonunu ve kolonize olmasını engellemekte olup; lizozim, tripsin, antikorlar ve tamamlayıcı bileşenleri içermektedir. Vücut yüzeylerinde yaygın olarak görülen lizozim, kanda dolaşımda, solungaç ve bağırsaklarda bulunan önemli savunma faktörlerinden birisi olup antiinflamatuar ve antiviral özelliklere sahiptir. Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı yüksek derecede bakterisit veya bakteriyostatik potansiyele sahiptir (Saurabh ve Sahoo, 2008). Lökositlerle bağlantılı olan lizozim enzimi bağışıklık yanıtın belirlenmesinde belirleyici olarak kullanılmaktadır.

1.2 Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) pasifik salmon cinsine bağlı olup, Salmonidae familyasına dahildir. Kuzey Amerika kökenli bir balık olan gökkuşağı alabalığı günümüzde tüm dünyada yayılım göstermektedir. Gökkuşağı alabalığı Avrupa'ya 1880 yılında ve Türkiye'ye 1967 yılında yetiştiriciliği yapılması amacıyla getirilmiştir. Türkiye bilimsel düzeyde gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğine 1971 yılında başlamıştır (FAO, 2017). Üretimin büyük bir kısmı tatlı suda yapılan yetiştiricilikten gelse de Karadeniz'de yapılan deniz yetiştiriciliğinde 2000 ton civarı büyük boy alabalık üretilmektedir (Okumuş, 2002). TÜİK verilerine göre 2008'den 2017 yılına kadar gökkuşağı alabalığı üretim miktarının sürekli olarak arttığı görülmektedir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1 Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği miktarları (TÜİK, 2019).

YIL	ÜRETİM MİKTARI (ton)
2008	154907
2009	163958
2010	174220
2011	196487
2012	215644
2013	238580
2014	239945
2015	246521
2016	258038
2017	281474

Optimum büyümeyi yaklaşık olarak 18°C'deki su sıcaklıklarında gerçekleştirebilen gökkuşağı alabalığının, 6-20 °C arasındaki su sıcaklıklarında büyümesi devam etmekte olup, 1°C'den düşük ve 25°C den daha yüksek sıcaklıktaki sularda ölümlerin meydana geldiği rapor edilmiştir. 6 mg/l'den daha yüksek çözünmüş oksijen miktarının ve 6-8,5 değerleri arasında pH'nın olmasının uygun olacağı belirtilmiştir (Pennell ve Barton, 1996). Soğuk ve temiz akan tatlı su kaynaklarını seven alabalıkların günümüzde hem havuz ve göllerde hem de denizlerdeki kafeslerde yetiştirme faaliyetleri gerçekleştirilmektedir (Tidwell, 2012).

1.3 Yersiniozis (Enterik Kızılağız Hastalığı)

Yersiniozis (enterik kızılağız hastalığı), alabalık üretiminde özellikle yavru ölümlerine sebep olan bakteriyel bir hastalıktır (Altun ve Diler, 1999). Genellikle tatlı sularda görülebilmesinin yanında, ülkemizde Karadeniz'de kafeslerde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında da yersiniozise bağlı ölümler olduğu belirtilmiştir (Karataş vd., 2004). Balık yetiştiriciliğinde stres sonucu ortaya çıkan ve akut ya da kronik olarak seyreden yersiniozis hastalığında akut epizootik enfekte oluşumlar %70'e varan balık ölümlerine sebebiyet vermektedir (Timur ve Timur, 2003). Yersiniozis hastalığının gökkuşağı alabalıklarındaki belirtileri deride kararma, ağızda hemoraji oluşumu ve şişmiş siyah renk dalak olarak karakterizedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Gökkuşağı alabalığında kızılağız hastalığının klinik belirtileri.

A: Kararmış deri ve şişmiş abdomen. B: Ağız çevresinde hemorajiler. C: genişlemiş siyah dalak (Kumar vd., 2015).

1.4 Balıklarda Büyüme Performansı ve Besin Kullanımı

Balıklar tüm canlılarda olduğu gibi yaşamlarını sürdürebilmek için başta yüzme olmak üzere yeni doku oluşumunda, metabolik işlemlerde ve boşaltımda enerjiye ihtiyaç duymaktadırlar (Jobling, 1996; Hoşsu vd., 2003). Balıkların ihtiyaç duyduğu üç ana enerji kaynağı olarak karbohidrat, yağ ve proteinler bilinmektedir (Bureau vd., 2002). Proteinden kazanılan enerji ile balığın yüzmesindeki hız ile süreklilik göstermediği ve yağdan gelen enerji sonucu yüzme performansının yükseldiği belirtilmiştir (Alsop ve Wood, 1997). Balıkta bir gram depo yağı bir gram vücut ağırlık artışını sağlarken, bir gram protein ise 4-5 gram vücut ağırlık artışı sağlamaktadır (Hoşsu vd., 2003). Bu durum, balıkların büyümesinde proteinlerin, enerji kazanmasında ise yağların ilk sırada kullanıldıklarının önemli bir göstergesidir. Yemin içeriğinin canlının yaşamsal faaliyetlerini sağlıklı bir şekilde sürdürebilmesine ve büyüme performansını arttırmasına yönelik hazırlanması önem taşımakta olup, ilave katkı maddelerinin de destekleyici özelliğinin kullanılması bu durumu desteklemektedir.

1.5 Bitkisel Kaynakların Kullanılması

Veteriner ilaçları olarak da kullanılan bitkisel ürünler, yan etki oranının çok düşük olmasıyla hayvanlarda özellikle koruma ve büyümeyi arttırma amacıyla tercih edilmektedir. Özellikle geniş spektrumlu ilaçların hayvanlarda kalıntı problemleri düşünüldüğünde bunları tüketen insanlarda etkilenebilmektedir. Yetiştiricilik sistemlerinde sorun olabilecek bakteriyel patojenlere karşı, antibiyotiklerin yeme katılarak balıklara verilmesi her ne kadar uygun görülse de çok fazla ilaca ihtiyaç

duyulmaktadır. Son yıllarda su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe karşılaşılan bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde ve kontrolünde çeşitli antimikrobiyaller kullanılmakta olup, bu süreçte antibiyotik dirençli bakterilerin gelişmesi ve balık dokularında kalıntı gibi büyük problemler ortaya çıkmaktadır (Terzi, 2018; Terzi vd., 2020). Antibiyotikler hastalıkların ortaya çıktığı zaman kullanılmaları nedeniyle koruma amaçlı verilememekte ve bu açıdan bağışıklık uyarıcıların önemi daha çok artmaktadır. Bitkisel bağışıklık uyarıcı kullanımında, bitki içerisindeki etken maddelerin bilinmesi, bu maddelerin organizmadaki işlevlerinin anlaşılması buna bağlı olarak kullanılan bitkinin hangi amaçla ne oranda uygulanacağının tespiti (örneğin; koruma, dezenfeksiyon, antimikrobiyal vs.) önem teşkil etmektedir. Bitkiler sadece bir değil onlarca etken madde ihtiva etmekte olup bazı etken maddelerin diğerlerine oranla yüksek miktarda olmasıyla etkisinin daha güçlü olacağı belirtilmektedir (Delaquis vd., 2002). Bitki özütleri vücut tarafından kolay absorbe edilmesi, tek bir maddeden oluşmayıp destekleyici maddeler içermesi, kalıntıya neden olmaması ve içeriğindeki molekül ağırlıklarının hücre tarafından emilimine uygun olması gibi özellikleriyle kimyasallardan farklı olarak avantajlar sunmaktadır (Poppenga, 2002).

1.6 Üryani Eriği

Ülkemizde bulunan erik türlerinden olan üryani eriği (*Prunus domestica*) (Şekil 1.3) Avrupa grubu eriklerden olup sadece Kastamonu çevresinde yetişmektedir. Seyrek dallı, dik yayvan veya sarkık taçlı ağaçtır. Taç yüksekliği 12 m'ye kadar ulaşır. Meyvelerin Eylül ayının ikinci haftasından dördüncü haftanın sonuna kadar olgunlaşır. Üryani eriği, B vitamini deposu olmakla birlikte farklı lif yapısıyla sindirimi kolaylaştırması, beden ve zihin yorgunluğunu gidermesiyle uzmanlar tarafından tavsiye edilmekte olup; ayrıca böbreklerin çalışmasına yardımcı olarak vücuttan toksik maddelerin atılmasına ve kansızlığa da iyi geldiği bilinmektedir (URL1, 2020).



Şekil 1.3 Üryani eriği (*Prunus domestica*).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Alabalık yetiştiriciliğinde kullanılan teknolojilerin gelişmesine bağlı olarak çiftliklerde stoklanan balık miktarı artmakta ve buna bağlı olarak da balıklarda meydana gelebilecek hastalıklara karşı bağışıklık kazandırma çalışmaları giderek önem kazanmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımını azaltmak amacıyla bitkisel bağışıklık güçlendiricilerin tercih edilmesi son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Bu amaçla söz konusu tıbbi bitki yağlarının veya özütlerinin balık yemlerine ilavesi gerçekleştirilmekte ve balıklar üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (Altunoğlu vd., 2017; Bilen vd., 2018; Bilen vd., 2019a; Bilen vd., 2020). Tıbbi bitkilerin, balıkların bağışıklık sistemlerine ve büyüme performanslarına sağladığı önemli avantajlar hakkında literatürde pek çok çalışmaya rastlanmaktadır.

Haghighi vd. (2014), gökkuşağı alabalığı yavrularında *Aloe vera* ekstraktı takviyeli 10 haftalık yem denemesinde, %1 konsantrasyonunda ekstraktın her 2 haftanın sonunda oksidatif radikal üretimini ve serum lizozim aktivitelerini önemli derecede arttırdığını belirtmişler ve özütün gökkuşağı alabalıklarında doğal bağışıklığı olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir. Dügenci vd. (2003), yem katkı maddesi olarak zencefil (*Zingiber officinale*), ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve ökse otu (*Viscum album*) bitkilerinin gökkuşağı alabalıklarında fagositik ve ekstrasellüler aktivitelerinde artış sağladığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Dorucu vd. (2009) gökkuşağı alabalıklarında çörek otu deneyerek NBT değerlerinde artış sağlamışken; Nya (2009), sarımsak ile NBT, lizozim, fagositik, serum bakterisidal aktivitelerinde artış elde ettiklerini bildirmiştir.

Diler vd. (2017), gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhyncus mykiss*) yem katkı maddesi olarak pelin otunun (*Artemisia vulgaris*), balıkların büyüme performanslarına ve histopatolojik sonuçlarına etkisini araştırdıkları çalışmalarında pelin otunu yeme toz (%0, %0,1, %0,5, %1,0, %2,0) veya etanolik ekstrakt (250 ve 1000 mg/kg) olarak ilave etmişlerdir. Pelin otu ilavesinin balıklarda; son ağırlığı, canlı ağırlık artışını, oransal büyümeyi, spesifik büyüme oranını, yem dönüşüm oranını toz (%0,1, %0,5, %1,0, %2,0) ve etanol ekstrakt (250, 1000 mg/kg) deneme gruplarında kontrole kıyasla

arttırdığını rapor etmişler ve en iyi yem dönüşüm oranının %0,1 ve %1,0 gruplarında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bilen vd. (2014), ısırgan otu (*Urtica dioica*) özütünün japon balıklarında (*Carassius auratus*) bağışıklık sisteme etkilerini araştırmışlar ve bu amaçla 0,1 ve 0,5 g/kg yem olacak şekilde iki farklı konsantrasyondaki özütü yem içerisine katarak japon balıklarında denemişlerdir. Balıkların bu yemlerle 30 gün boyunca beslenmesi sonunda, tüm bağışıklık yanıtların kontrol grubuna göre her iki doz denenen balıklarda kayda değer artış olduğunu, en yüksek değerin %0,5 ısırgan otu içeren grupta görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre ısırgan otu özütünün japon balıklarında etkili bir bağışıklık uyarıcı olduğu belirtilmiştir (Bilen vd., 2014). *Ocimum sanctum* (Logambal vd., 2000); *Eclipta alba* (Christybapita vd., 2007); *Solanum trilobatum* (Divyagnaneswari vd., 2007); *Nyctanthes arbortristis* (Kirubakaran vd., 2010); *Toona sinensis* (Wu vd., 2010) bitkileri mozambik tilapyalarında (*Oreochromis mossambicus*) yem katkı maddesi olarak kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre oksidatif radikal üretimi ve/veya lizozim değerlerinin arttığı rapor edilmiştir. Yine Nil tilapyalarında (*Oreochromis niloticus*) denenen *Allium sativum* (Aly vd., 2008); *Echinacea purpurea* (Mesalhy vd., 2008) ve *Nigella sativa* (Diab vd., 2008) bitkilerinin balıkların oksidatif radikal üretimleri ve/veya lizozim aktivitelerinde önemli etkiler gösterdiği rapor edilmişir.

Altunoğlu vd. (2017), yeme ilave ettikleri çörek otu (*Nigella sativa*) sulu metanolik özütünün (0,1 ve 0,5 g/kg yem) gökkuşağı alabalıklarında bağışıklık yanıtlara etkisini 30 gün süreyle yaptıkları besleme çalışmasıyla araştırmışlardır. Altunoğlu vd. (2017) oksidatif radikal üretiminin, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış gösterdiğini belirterek gökkuşağı alabalıklarında bazı immun hümoral yanıtlar geliştirdiğini bildirmişlerdir.

Bilen vd. (2013), 0, 0,5, 1, 1,5 g/kg dozlarındaki tetra (*Cotinus coggygria*) metanolik özütünü besin takviyesi olarak 4 hafta boyunca koi balıklarında (*Cyprinus carpio*) denemişler ve *Vibrio anguillarum* enfeksiyonuna karşı etkilerini araştırmışlardır. 1,5 g/kg tetra verilen grupta oksidatif radikal üretim değerini en yüksek tespit ermişlerdir. Lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinin de kontrol grubuna göre önemli oranda

yüksek bulunduğu çalışmada, hemoglobin ve akyuvar konsantrasyonları 1 g/kg tetra içeren grupta en yüksek değerine ulaştığı bildirilmiştir.

Christybapita vd. (2007), yer paskalyası (*Eclipta alba*) yaprağı ekstraktını mazambik tilapya balıklarında (*Oreochromis mossambicus*) farklı dozlarda deneyerek (%0,01, %0.1 ve % 1) bağışıklık yanıtlarını değerlendirdikleri çalışmada; lizozim aktivitesinin en yüksek değerine %1 sulu metanolik ekstrakt grubunda 2. haftada gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Christybapita vd. (2007), 3 haftalık deneme sonunda ise hemolitik komplement aktivitesi, myeloperoksidaz aktivitesi ve oksidatif radikal üretiminin gruplar arasında farklılık göstermediğini belirtmişlerdir.

Bilen vd. (2016a), gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) gebre otunu *(Capparis spinosa)* deneyerek, balıkların spesifik olmayan bağışıklık sistemine ve büyüme performansına etkisini araştırmışlardır. 0.1 ve 0.5 g/kg olacak şekilde yeme ilave ettikleri gebre otu metanolik özütlerinin balık serumlarındaki fagozitik, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerine etkilerine araştırmışlardır. Sonuçta gebre otunun fagozitik aktiviteyi arttırdığını ve lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinde ise 0.1 g/kg konsantrasyonunda önemli değişim görüldüğü belirtmişlerdir.

Bilen vd. (2016b) istiridye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) ve ısırgan otu (*Urtica dioica*) metanolik ekstraklarını denedikleri gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) yaşama oranlarını karşılaştırdıkları kontrol testini *Aeromonas hydrophila* patojenine karşı gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla kavak mantarı ve ısırgan otu sulu metanolik ekstraktlarını 0,1 ve 0,5 g/kg olacak şekilde yeme ilave etmişlerdir. Deneme gruplarının tümünde fagozitik aktivitenin ve ORÜ değerlerinin tüm deneme gruplarında kontrol grubuna kıyasla arttığını ve lizozim aktivitesinin ise yine kontrol grubuna göre deneme gruplarında artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bilen vd. (2019b), gökkuşağı alabalıklarının yemlerine ilave ettikleri *Usnea barbata* sulu metanolik özütünün farklı konsantrasyonlarda (4 mg, 8 mg, 12 mg) IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-reg, IFN1, IFN2, TGF-β ve TNFα sitokinleri üzerinde kontrol grubuna kıyasla genel olarak bir artış sağladığı, 3. gün ise sitokinlerin genellikle en yüksek değerlerine ulaştığını belirtmişlerdir. Sönmez vd. (2018), siklopamini farklı

dozlarda denedikleri (10 mg, 20 mg ve 30 mg) gökkuşağı alabalıklarında IL-1β gen ekspresyon seviyelerinin deneme gruplarında 4, 8 ve 24. saatlerde kontrol grubuna göre düşük olduğunu ($P<0,05$), IL-8 geninin ise 1, 4 ve 8. saatlerde kontrol grubuna göre düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte Sönmez vd. (2018) parazit, virüs ve bakterilere karşı koruma amaçlı eksprese olan IL-12 geninin 1. ve 12. saatlerde kontrole göre yükseldiğini bildirmişlerdir. Solunum patlaması aktivitesi seviyesi, pleiotropik sitokin ve çok yönlü sitokinle ilişkili genler olan IL-6 ve IL-10 genlerinin ise 1. ve 12. saatlerdeki ekspresyonlarının deneme gruplarındaki seviyelerinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Yem katkı maddesi olarak bitkisel ürünlerin kullanımının balıklarda hastalık direncini daha da arttırdığı literatür bilgileri içerisinde yer almaktadır. Örneğin; gökkuşağı alabalıklarında sarımsak (Nya ve Austin 2009) ve allisin (Nya vd., 2010) *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı hastalık direncini arttırırken; nil tilapyalarında; karanfilin *Lactococcus garvieae* enfeksiyonuna (Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2009a), *Andrographis paniculata* bitkisi ise *Streptococcus agalactiae* bakterisinin sebep olduğu enfeksiyona karşı hastalık direncini arttırmaktadır (Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2009b). Bununla birlikte Zilberg vd. (2010) biberiyenin hem *Streptococcus iniae* hem de *Streptococcus agalactiae* bakterilerine bağlı enfeksiyonlara karşı *Oreochromis sp*. türünde hastalık direncini geliştirdiğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Deneme Balıkları

Denemede ortalama ağırlıkları 27,61±0,44 g olan 480 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Deneme balıkları Kastamonu Üniversitesi İç Su ve Deniz Balıkları Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Temin edilen gökkuşağı alabalıkları 2 hafta boyunca adaptasyon sürecine tabi tutulmuştur. Adaptasyon sonrası balıklar tanklara eşit ağırlıkta ve sayıda dağıtılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce Kastamonu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından izin alınmıştır.

3.1.2 Deneme Yeri ve Deney Sistemi

Deneme, Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Kapalı Devre Sisteminde 21 gün boyunca beslenen balıklardan alınan örneklerin analizleri, Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda deney prosedürlerine tabi tutularak yapılmıştır. Araştırmada kullanılan kapalı devre sistem çökeltme havuzu, torba filtre, kum filtre, UV filtre ve ısıtma-soğutma ünitesinden oluşmakta olup, deneme için her biri 500 L olan tanklar kullanılmıştır. Gökkuşağı alabalıkları, dairesel tanklara rastgele 40 adet olacak şekilde stoklanmıştır. Balıklar deneme gruplarına metanolik özüt konsantrasyonlarına göre toplam 4 gruba (kontrol, %0,1, %0,5, %1) ayrılmıştır. Her bir grup için 3'er tekerrür olacak şekilde toplam 12 adet tank kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Üryani Eriği Sulu Metanolik Ekstraktının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan olan üryani eriği Kastamonu ilinden temin edilmiştir. Etüvde 40 °C'de 2 gün boyunca kurutulmuş ve kurutma işlemi bittikten sonra üryani eriğinin sulu metanolik özütleri çıkartılmıştır (Bilen, vd., 2016a). Sulu metanolik özütü çıkarma

işleminde, % 40'lık 1 litre metanol çözeltisi hazırlanmış ve içerisine 100 g öğütülmüş erik tozu eklenmiştir. Karışım gölge ve serin yerde günde iki defa ters yüz edilerek üç gün boyunca bekletilmiştir. Daha sonra bu örnekler filtre kâğıdından geçirilerek iri partiküllerden uzaklaştırılmıştır. Süzülmüş çözelti vakum evaporatöre aktarılarak önce 60 °C'de metanol sonra 80 °C'de suyun uçurulması sağlanmıştır (Şekil 3.1.). Çalışma sonunda özüt miktarını net olarak belirlemek için 50 g saf su, evaporatör balonu içinde yer alan özüte eklenmiş ve gram ağırlık alınarak özüt miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra bu özütler çalışmada kullanılıncaya kadar –20 °C'de saklanmış, çalışma müddetince de +4 °C'de tutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan üryani özütü sulu metanolik özütünün kalitatif içeriği GC-MS sonuçlarına göre Tablo 3.1'de belirtildiği şekildedir.



Şekil 3.1 Sulu metanolik karışımının evaporatörde uçurulması (Özgün).

Tablo 3.1. Üryani eriği özütünde GC-MS ile belirlenen bileşenler.

% Oran	**İsim**
0,52	Oxetane, 2,2,4-trimethyl-
0,16	Heptane, 2,3-epoxy-
0,93	Furan, 2-butyltetrahydro- (CAS)
0,11	Oxalic acid, allyl undecyl ester
3,90	3-Hexanone
6,69	2-Hexanone
3,61	3-Hexanol
6,10	Pentanol <1-methyl->
0,16	1-Hexanol (CAS)
0,19	2,4-Hexanedione (CAS)
0,10	Nonane, 2,5-dimethyl-
0,11	Acetic acid, (3-allyloxy-1,1-dimethylbutyl) ester
0,08	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate
10,00	Hexane, 2-nitro-
0,10	2-Heptenal, (E)- (CAS)
9,15	Pentane, 3-ethyl-2,4-dimethyl- (CAS)
0,99	3-Hexen-2-one
0,13	Cyclohexane, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-
0,16	Cyclohexane, 1-isopropyl-1-methyl-
0,17	Lauryl acetate
0,43	Decane (CAS)
0,08	beta.-Citronellol, methyl ether
0,24	Benzene, 1,3-dichloro-
0,16	1-Propene, 1-Cyclohexyl-2-Methyl-
0,14	Benzyl alcohol
0,10	Naphthalene, decahydro-
0,10	Tetradecane
0,23	Vanillin
0,12	a tetradecanol
0,13	Diethyl Phthalate
0,32	Bicyclo[10.1.0]tridec-1-ene
1,15	n-Hexadecanoic acid
0,51	Dı-(9-Octadecenoyl)-Glycerol
0,39	2-Ethylbutyric acid, eicosyl ester
0,19	9-Octadecynenitrile
0,37	Oleanitrile
1,43	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester
0,34	7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
2,85	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-
6,29	Oleic Acid
0,16	Octadecanoic acid
1,69	Octadecanamide
2,41	22-Tricosenoic acid
4,51	6,9-Octadecadienoic acid, methyl ester (CAS)
5,20	9-Octadecenamide (CAS)
26,50	13-Docosenamide, (Z)-
0,61	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS)
100.00	

3.2.2 Araştırma Yemleri ve Yemleme Programının Düzenlenmesi

Araştırma ticari bir firmadan (Özpekler Yem Ltd. Şti., Denizli) elde edinilen alabalık büyütme yemi kullanılmıştır. Deneme grubu için yemler ticari yemin içerisine üryani

eriği sulu metanolik özütleri spreylenerek eklenmiş ve yemler kullanılmaya hazır hale getirilmiştir (Bilen vd., 2016).

Balıklar deney süresince sabah saat 9:00 ve akşam saat 16:00 olmak üzere günde iki kez doyana kadar beslenmişlerdir. Verilen yemin tamamının balıklar tarafından tüketilmesine özen gösterilmiştir.

3.2.3 Balıklardan Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Denemenin 7, 14 ve 21. günlerinde humoral yanıtlar için balıklardan kan örnekleri ve hücresel yanıtlar için böbrek, bağırsak ve dalak örnekleri alınmıştır. Bu amaçla her bir tanktan 3'er adet (9 balık/grup) olacak şekilde örnekleme yapılmıştır. Balıklar rastgele ve hızlıca deneme tanklarından yakalanmış, en kısa süre içerisinde karanfil yağı (40µl/L) bulunan 10 litrelik plastik kovalarda anastezi altına alınmıştır. Bayıltma işleminden sonra kan alımı için heparin içeren 1 ml'lik insülin enjektörleri kullanılmış ve kaudal venadan kan alınmıştır. Serum analizleri için tüplerdeki kan örnekleri 5300 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen serum analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.4 Bağışıklık Yanıtların Belirlenmesi

3.2.4.1 Oksidatif radikal üretimi

NBT indirgenmesi yöntemi kullanılarak oksidatif radikal üretimleri tespit edilmiştir (Siwicki ve Anderson, 1993a) . Bunun için 0,1 ml kan örnekleri alınarak, %0,2 NBT içeren 0,1 ml solüsyon ile karıştırılmıştır. 24 °C'de 30 dk bekletilen bu karışımın aktivasyonu durdurabilmek için cam tüplere aktarıldıktan sonra 1 ml N,Ndimethilformamid eklenmiştir. 4000 rpm hızında 5 dk santrifüj edilerek partiküller süspansiyondan ayrılmıştır. Bu karışım spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda N,N-dimethil formamid kör örneğine karşı okunmuştur.

3.2.4.2 Bakteriyel öldürme aktivitesi

Bakteriyel öldürme aktivitesinde Siwicki ve Anderson (1993b) yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Her bir balık için 50 µl kan örneği ve 50 µl kültür örneği (FBS+rpmi kültür medya+antibiyotik karışımı) 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Daha sonra örnekler 1 saat inkübasyona bırakılmış ve devamında her bir kuyucuğa 50 µl NBT [içerisinde formalin ile öldürülmüş ve PBS ile yıkanmış *Aeromonas hydrophila* bakterisi (NBT solüsyonu içindeki bakteri yoğunluğu: 1 X $l0^8$ KOB/ml) bulunan solüsyon] ilave edilmiştir. Sonrasında plakalar 5 dakika santrifüj edilerek 30-60 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler %100 metanol ile 5 dakika fikse edilmiş ve 3 kez % 70'lik metanol ile yıkanmıştır. Yaklaşık 40 dk çeker ocakta metanol uçurulmuştur. Plaklar kuruduktan sonra kuyucuklara 100 µl 2 M KOH ve 70 µl DMSO sırasıyla ilave edilmiştir ve spektrofotometrede 620 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3 Lizozim aktivitesi

Serum lizozim aktivitesi, 1 tablet fosfat tamponlu tuz (PBS) ve 0,02 g *Micrococcus lysodeicteus* bakterisinin 100 ml saf suda çözülmesiyle elde edilen karışıma 40 µl serum eklenerek ve 530 nm'de 0. ve 4. dakikalarda okutularak tespit edilmiştir (Ellis, 1990).

Lizozim = [(ilk okuma-son okuma)*1000] / serum miktarı= U/µl

3.2.4.4 Myeloperoksidaz aktivitesi

Plazmadaki toplam MPO içeriği Quade ve Roth (1997) ve Cuesta vd. (2002) yöntemlerinin modifiye edilmesiyle yapılmıştır. İlk olarak 1 tablet fosfat sitrat 100 ml saf suda çözülerek bir çözelti hazırlanmıştır. Sonrasında 1 tablet tetramethilbenzidin dihidroklorür ilk hazırlanan çözeltiden 10 ml alınarak çözülmüştür. Daha sonra 370 µl Hank's Balanced Solüsyonu (HBSS) 30 µl serum ile karıştırılmış ve okutmandan hemen önce karışım çözeltiden 100 µl üzerine eklenmiştir. 0. ve 4. dakikalarda 450 nm'de okutmaları gerçekleştirilerek aşağıdaki formüle göre hesaplamaları yapılmıştır.
MPO = Absorbans farkı * 1906,4 = U/ µl

3.2.4.5 Gen ekspresyonu

Çalışmada her 7, 14 ve 21. günler sonunda balıkların ön böbrek dokuları alınmış ve bu dokulardan ilk önce toplam RNA izolasyonu yapılmış ve sonrasında cDNA'lar oluşturularak ölçümleri yapılmıştır. Uygun primerler kullanılarak balıkların gen sunumları tespit edilmiştir.

3.2.4.6 Toplam RNA izolasyonu

Örnekleme zamanlarında gökkuşağı alabalıklarından alınan böbrek, bağırsak ve dalak dokuları RNAlater Solüsyonuna (ThermoFisher Scientific) alınmış ve analiz edilinceye kadar -80°C'de saklanmıştır. Toplam RNA izolasyonu, kullanılan BIOLINE kiti (ISOLATE II RNA Mini Kiti) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, yaklaşık 30 mg bağırsak, dalak ve böbrek örnekleri ayrı ayrı RNA izolasyonu için alınmıştır. Örnekler 600 µl Trizol içerisinde homojenizatör kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen örneklerden üretici protokolüne göre santrifüj adımları uygulanarak Total RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA'nın saflığı ve kalitesi Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Miktarı belirlenen örnekler 15 ng/µl olacak şekilde seyreltilerek cDNA hazırlamada kullanılmıştır.

3.2.4.7 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Seyreltilen RNA örnekleri genomik DNA'nın uzaklaştırılması için 1 U DNase I (BIOLINE) ile muamele edilmiştir. İzole edilen Toplam RNA'lardan BIOLINE kit (SensiFAST TM cDNA Synthesis Kit) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu işlemde 1 µg seyreltimiş ve genomik DNA'sı uzaklaştırılan RNA, 15 pmol/µl oligo dT primer, 4 µL 5x TransAmp Buffer, 1 µL of Reverse Transcriptase ve 20 µL nükleaz içeremeyen su eklenerek reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Reaksiyon karışımı thermal cycler (ThermoFischer Scientific) içerisinde 25 °C'de 10 dk tavlama, 42 °C'de 15 dakika ters transkripsiyon ve 85 °C'de 5 dakika inaktivasyon aşamalarından geçirilerek cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'nın saflığı ve kalitesi Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Miktarı belirlenen

örnekler 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilerek gen sunumlarının belirlenmesinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.8 Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi

cDNA sentezinden sonra qRT-PCR analizi Rotor-Gene qPCR algılama sistemi (Qiagen, Almanya) ve SensiFAST SYBR No-ROX Kit PCR kiti (BIOLINE) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada eksprese edilen genlerin spesifik primer dizileri ve referansları Tablo 3.2'de listelenmiştir. qRT-PCR karışımı; 12.5 µl 2x SYBR Green Master Mix, 0.1 µg template DNA, 0.4 mM her gene spesifik ileri ve geri primerler (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ve referans olarak β-actin) ve 25 µl son hacime ulaşmak için saf su içermektedir. qRT-PCR denaturasyon, yapışma ve uzatma olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi analizini gerçekleştirebilmek için floresan sinyalleri, saniye başına her 0,5 °C'de 60°C'den 95°C'ye kadar 530 nm dalga boyunda alındı. Deney ve kontrol gruplarından 3 farklı örnekle gerçekleştirilen işlem sonuçları yapılan deneylerde her örnek için 3 tekerrür olarak değerlendirildi.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan primerler.

Gen	Primer (5'-3')	Boyut (bp)	Kaynaklar
β-Actin	F5' ATGGAAGGTGAAATCGCC 3' R5' TGCCAGATCTTCTCCATG 3'	186	Sigh vd., 2004
IL-1β	F5' ACCGAGTTCAAGGACAAGGA 3' R5' CATTCATCAGGACCCAGCAC 3'	181	Awad vd., 2011
IL-6	F5' ACTCCCCTCTGTCACACACC 3' R5' GGCAGACAGGTCCTCCACTA 3'	91	Chetteri vd., 2011
IL-8	F5' CACAGACAGAGAAGGAAGGAAAG 3' R5' TGCTCATCTTGGGGTTACAGA 3'	162	Awad vd., 2011
IL-10	F5' CGACTTTAAATCTCCCATCGAC 3' R5' GCATTGGACGATCTCTTTCTTC 3'	70	Raida vd., 2011
IL-12	F5' GAACCCAGACGACGATGATT 3' R5' GTTCAAACTCCAACCCTCCA 3'	190	Komatsu vd., 2009

3.2.5 Büyüme Performansı

Çalışma sonunda tüm balıkların başlangıç ve bitiş ağırlıkları alınarak ve tüketilen yem miktarları belirlenerek büyüme performansı hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

Spesifik büyüme oranı (3.1);

SBO= 100 x (Ln Wf – Ln Wi / t) (3.1)

SBO : Spesifik büyüme oranı

Wf : Periyot sonundaki bireysel ağırlık

Wi : Periyot başındaki bireysel ağırlık

t : Zaman (gün olarak)

formülleri ile hesaplanmıştır (Ricker, 1979).

Deneme grupları için periyodik olarak tüketilen yem miktarları ayrı ayrı hesaplanarak bulunmuştur. Her periyotta tüketilen toplam yem miktarı tanktaki balık sayısına bölünerek ortalama bireysel yem tüketim miktarı hesaplanmıştır. Yemden yararlanma oranı (3.2);

YYO = Periyot süresince tüketilen yem miktarı (g) / Periyottaki CAA (g) (3.2)

YYO : Yemden yararlanma oranı

CAA : Canlı ağırlık artışı

şeklinde hesaplanmıştır (Ricker, 1979).

3.2.6 Histopatoloji

Çalışma sonunda her gruptan histopatolojik değerlendirme için balık örnekleri alınmıştır. Çalışma gruplarındaki balıklardan alınan dalak, karaciğer, solungaç ve arka böbrek dokusu örnekleri tespit için % 10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Tespiti takiben dokular % 70'lik alkolde 24 saat, % 80'lik ve %96'lık alkolde 1'er saat, absolute alkolde ise 2 saat bekletildikten sonra metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilip paraplastta bloklanmıştır. Her bir parafin bloktan mikrotom (Leica RM 2155, Germany) yardımıyla 50 µm aralıklarla 5 µm kalınlığında

3’er adet kesitler alınmıştır. Histopatolojik değerlendirilme için kesitlere hematoksilen-eozin (H&E) boyaması yapılmıştır. Kesitler ışık mikroskobu (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) altında değerlendirilip istenilen bölgelerden mikroskoba entegre digital kamerayla (DP74, Olympus, Tokyo, Japan) görüntüler alınmıştır.

3.2.7 Kontrol Testi

Çalışmanın 21. gününün sonunda kontrol grubu dahil tüm deney gruplarındaki balıklara intraperitonal olarak $1x10^7$ KOB/ml dozunda *Yersinia ruckeri* (100 µl PBS içerisinde) bakterisi enjekte edilerek balıklar kontrol testine tabi tutulmuş ve gruplara göre yaşama oranları 10 gün boyunca kaydedilmiştir.

3.2.8 İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen sonuçlar, SPSS 16 programı yardımıyla önce varyansların homojenlikleri Levene testi ile belirlenerek daha sonra varyans analizine (ANOVA) sonra da LSD Multiple Range Test’ine tabi tutularak yapılmıştır ($P< 0,05$). Kontrol testinde kaydedilen yaşama oranları Kaplan Meier hayatta kalma oranı testine tabi tutulmuştur. Önemli farklılık bulunduğunda ise ortalamalar arasındaki karşılaştırma Log Rank Testi ile yapılmıştır ($P<0,05$).

4. BULGULAR

4.1 Büyüme Performansında Meydana Gelen Değişimler

Farklı dozlarda üryani eriği ekstraktı ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının büyüme performansları başlangıç ve bitiş ağırlığı; ağırlık kazanımı, spesifik büyüme oranı ve yem dönüştürme oranları açısından değerlendirilmiştir. Sonuç olarak kontrol, %0,1, %0,5 ve %1 grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir (P>0,05) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Üryani eriği ekstraktı ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının büyüme performansı.

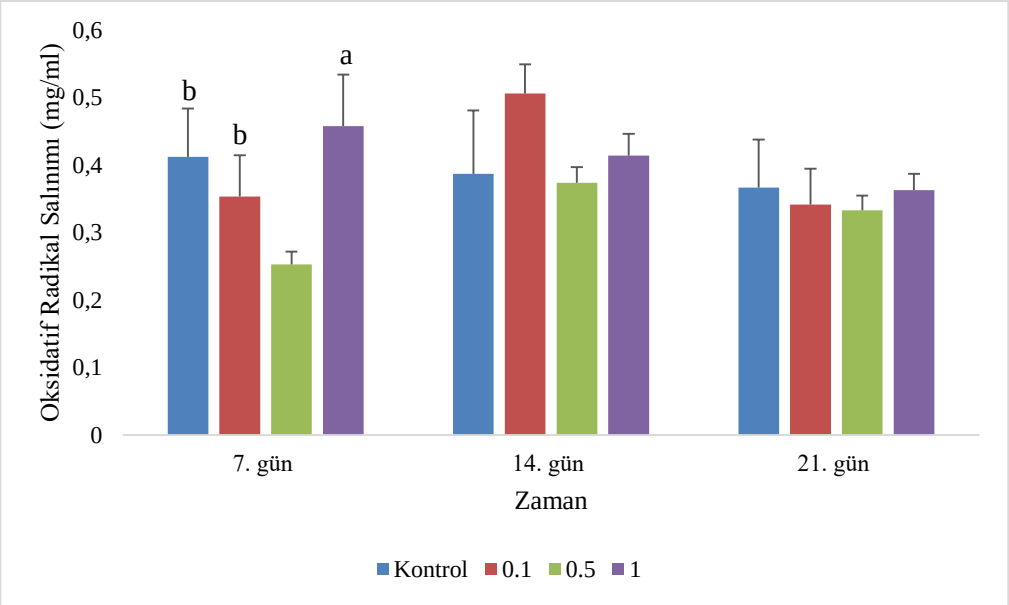
	Başlangıç (g)	Bitiş (g)	Ağırlık kazanımı (%)	SGR	FCR
Kontrol	27,38±0,64	48,46±3,41	76,47±8,87	2,69±0,25	1,09±0,08
%0,1	26,77±0,32	52,27±1,47	95,22±3,99	3,18±0,10	0,96±0,02
%0,5	28,63±0,21	49,66±1,59	73,43±4,52	2,62±0,12	1,18±0,08
%1	27,67±0,53	51,08±1,55	84,62±4,23	2,92±0,11	1,05±0,05

SGR: Spesifik Büyüme Oranı; FCR: Yem Dönüştürme Oranı. Kontrol, 0,1, 0,5 ve 1, sırasıyla %0, %0,1, %0,5 ve %1 oranında balık yemine katılan özüt dozunu belirtir.

4.2 İmmünolojik Bulgular

4.2.1 Oksidatif Radikal Üretimi

Denemenin 7, 14 ve 21. günlerinde balıkların oksidatif radikal üretimi kandaki aktif lökositlerin 96 kuyucuklu plakaya yapışması ve NBT pozitif hücrelerin verdiği tepkinin spektrofotometrik ölçümü ile saptanmıştır. Elde edilen bulgulara göre oksidatif radikal üretimi 7. günde kontrol grubunda 0,41±0,07 mg/ml iken, %1 lik grupta 0,45±0,07 mg/ml olarak tespit edilmiş ve bu artışın önemli olduğu görülmüştür (P<0,05). 14. ve 21. günlerde gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (P>0,05) (Şekil 4.1).

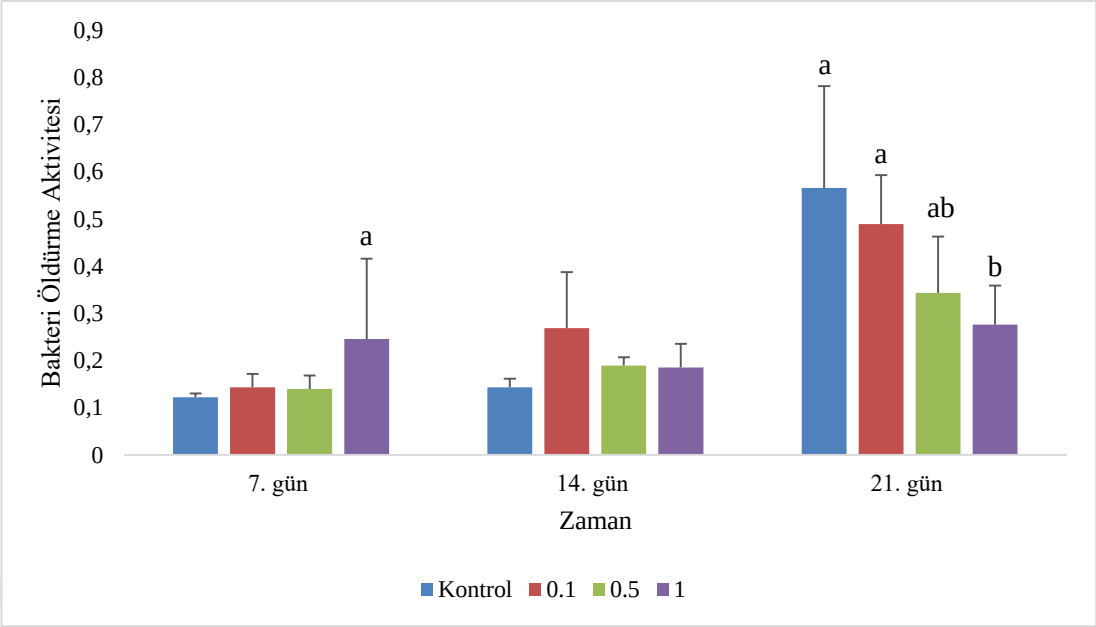


Şekil 4.1 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının oksidatif radikal üretimlerinde meydana gelen değişimler (mg/ml).

Kontrol, 0,1, 0,5 ve 1, sırasıyla %0, %0,1, %0,5 ve %1 oranında balık yemine katılan özüt dozunu belirtir. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.2.2 Bakteriyel Öldürme Aktivitesi

Çalışmanın 7. günde bakteriyel öldürme aktivitesinin %1 üryani eriği ekstraktı denenen grupta en yüksek seviyede olduğu ve diğer gruplara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($P<0,05$). Denemenin 14. gününde gruplar arasında bakteriyel öldürme aktivitesi istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir ($P>0,05$). 21. günde ise bakteri öldürme aktivitelerinin (%0,1, %0,5 ve %1 için sırasıyla 0,49±0,10, 0,34±0,12 ve 0,27±0,08) üryani eriği konsantrasyonu arttıkça kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiş olup, kontrol, %0,1 ve %0,5 grupları arasında bu düşüşün önemli olmadığı görülmüştür ($P>0,05$) (Şekil 4.2).

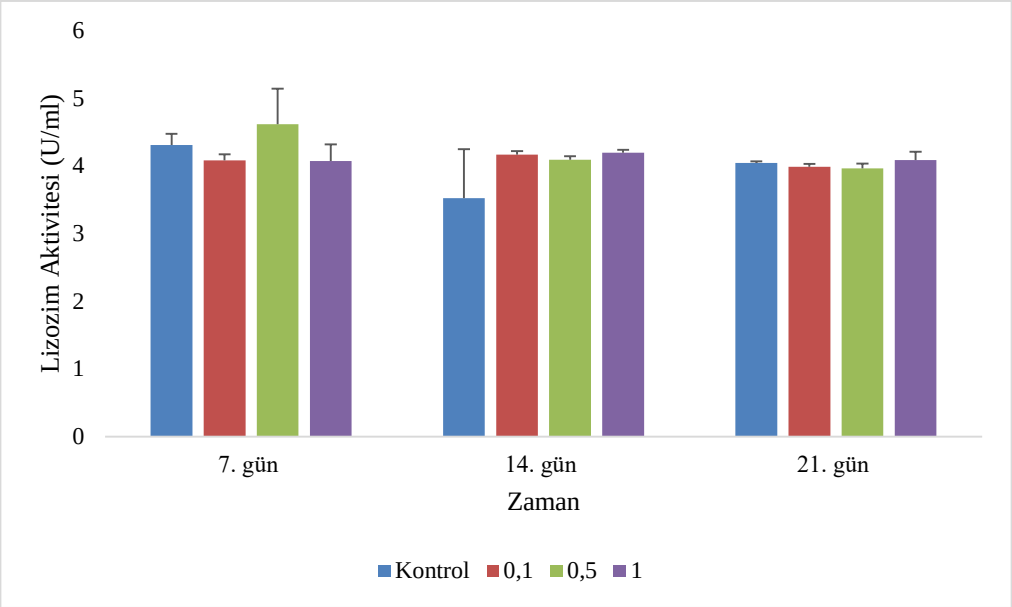


Şekil 4.2 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bakteriyel öldürme aktivitelerinde meydana gelen değişimler.

Kontrol, 0,1, 0,5 ve 1, sırasıyla %0, %0,1, %0,5 ve %1 oranında balık yemine katılan özüt dozunu belirtir. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.2.3 Lizozim Aktivitesi

Lizozim direkt etkide kan serumunda bulunan bakterileri hedef alır ve onları fagositoza hazırlamada rol oynayan bir maddedir veya direkt olarak polimorfonükleer lökositler ile makrofajları aktive etmektedir. Çalışmanın 7, 14 ve 21. günlerinde deneme gruplarının lizozim aktivitelerinin, kontrol grubuna göre önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir (P>0,05) (Şekil 4.3).

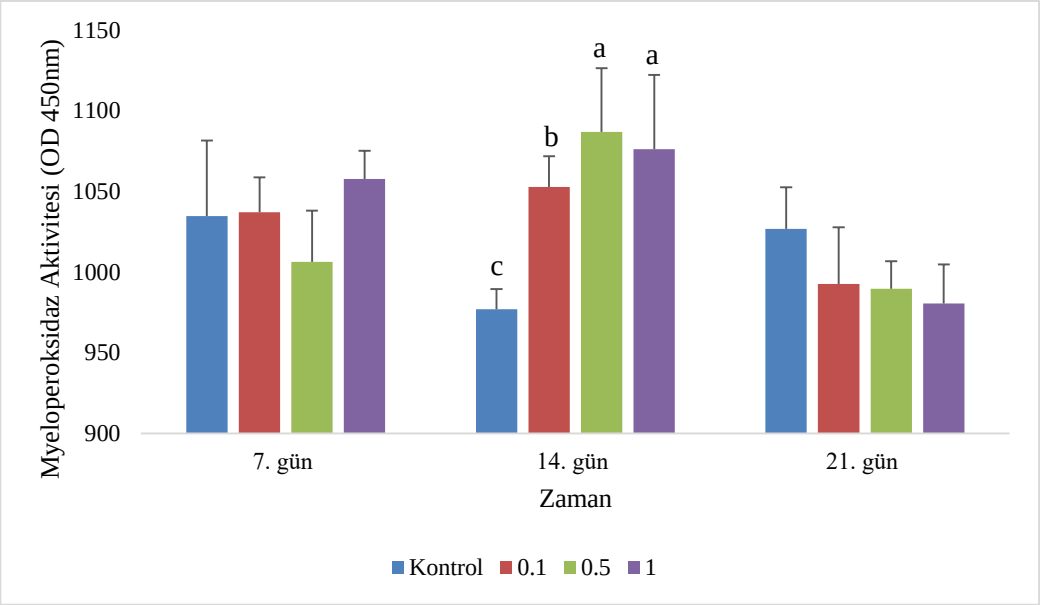


Şekil 4.3 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının lizozim aktivitelerinde meydana gelen değişimler.

Kontrol, 0,1, 0,5 ve 1, sırasıyla %0, %0,1, %0,5 ve %1 oranında balık yemine katılan özüt dozunu belirtir.

4.2.4 Myeloperoksidaz Aktivitesi

Çalışmanın 14. gününde myeloperoksidaz aktiviteleri kıyaslandığında deneme gruplarının myeloperoksidaz aktivitelerinin (%0,1, %0,5 ve %1 sırasıyla 1052,8±19,09, 1087±39,47 ve 1076,2±46,02) kontrol grubuna (977±12,60) göre önemli derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir ($P<0,05$). Fakat 7. ve 21. günlerde ise deneme gruplarının myeloperoksidaz seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının myeloperoksidaz aktivitesinde meydana gelen değişimler.

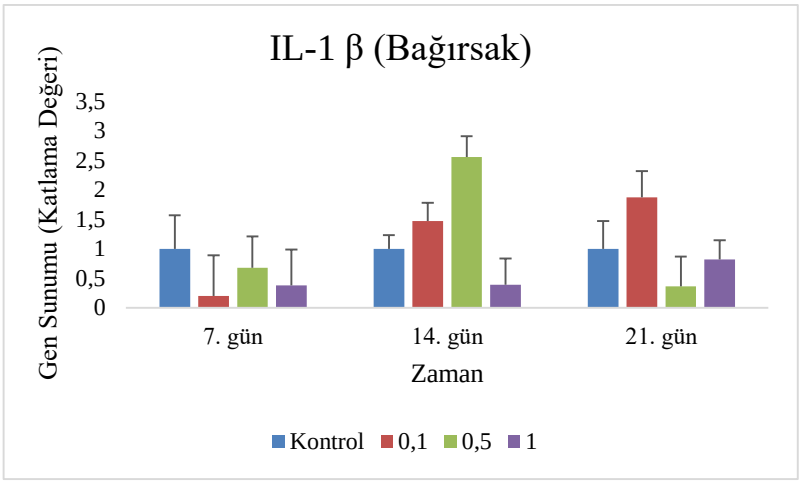
Kontrol, 0,1, 0,5 ve 1, sırasıyla %0, %0,1, %0,5 ve %1 oranında balık yemine katılan özüt dozunu belirtir. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

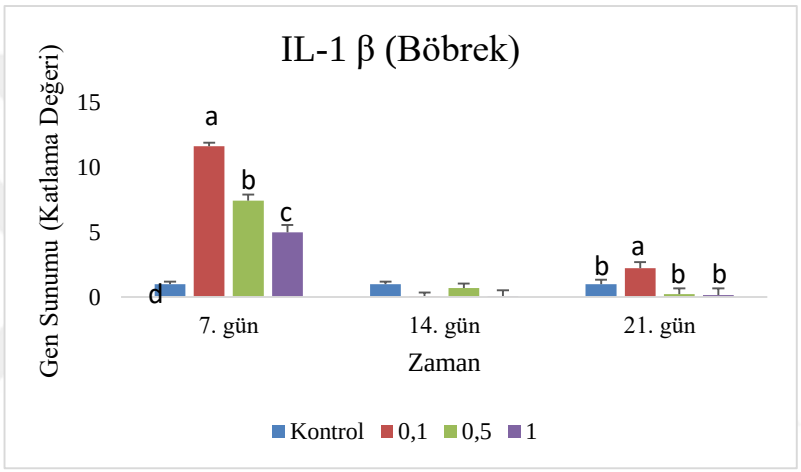
4.2.5 Gen Sunumları

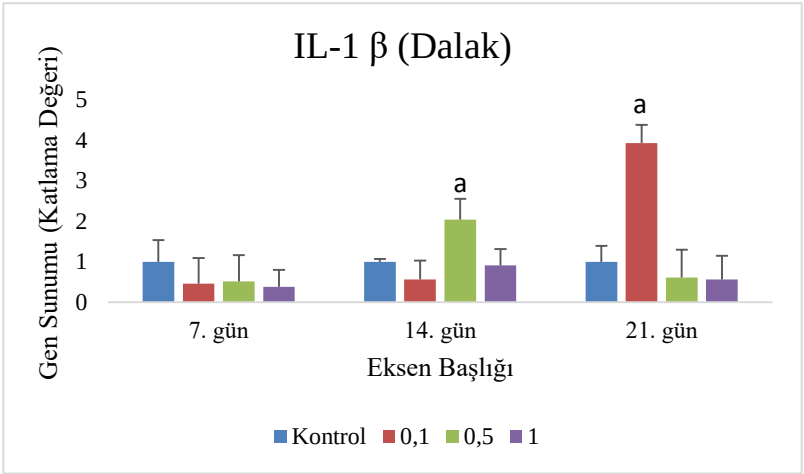
Çalışmanın 7, 14 ve 21. günlerinde balıkların bağırsak, böbrek ve dalak dokuları alınmış ve sonrasında bu dokulardan Total RNA izole edilmiştir. Total RNA'ların izolasyonundan sonra cDNA sentezi yapılmıştır. Son olarak bu cDNA örneklerinden IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ve COX-2 genleri belirlenmiştir.

4.2.5.1 IL-1β

Yapılan örneklemelerde IL-1β geninin bağırsaktaki ekspresyon seviyelerinde kontrol ve deneme grupları arasında herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Fakat bu durum böbrek ve dalakta farklılıklar göstermiştir. Böbrek dokusunda söz konusu genin ekspresyon seviyelerinin 7. ve 14. günlerde % 0,1'lik grupta kontrol ve diğer gruplara göre en yüksek seviyede olduğu ($P<0,05$); dalakta da benzer şekilde 21. günde diğer tüm gruplara göre IL-1β geninin önemli derecede katlama değerinde artış olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$) (Şekil 4.5).





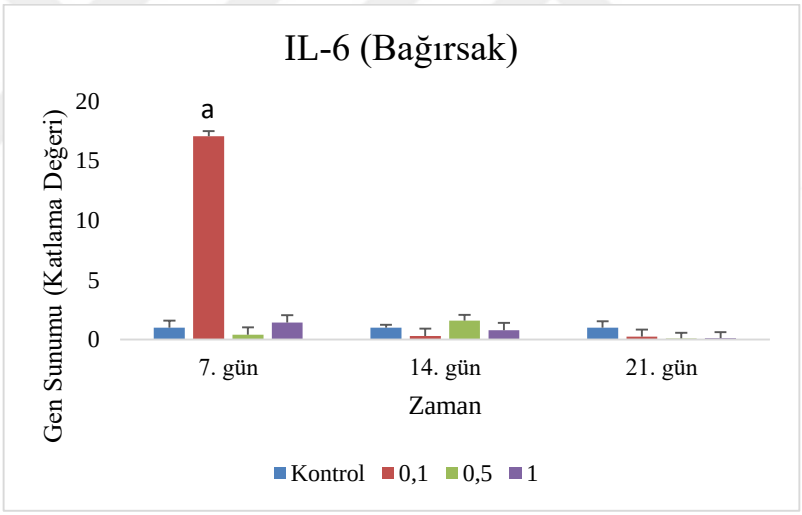


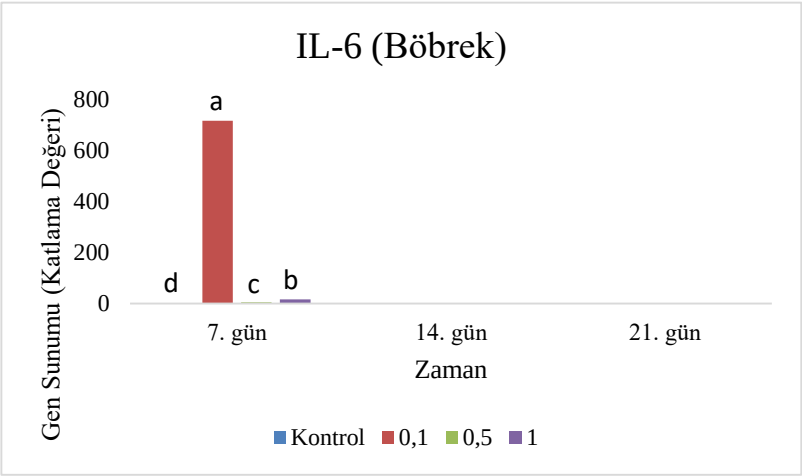
Şekil 4.5 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-1β geninin ekspresyon seviyeleri. IL-6

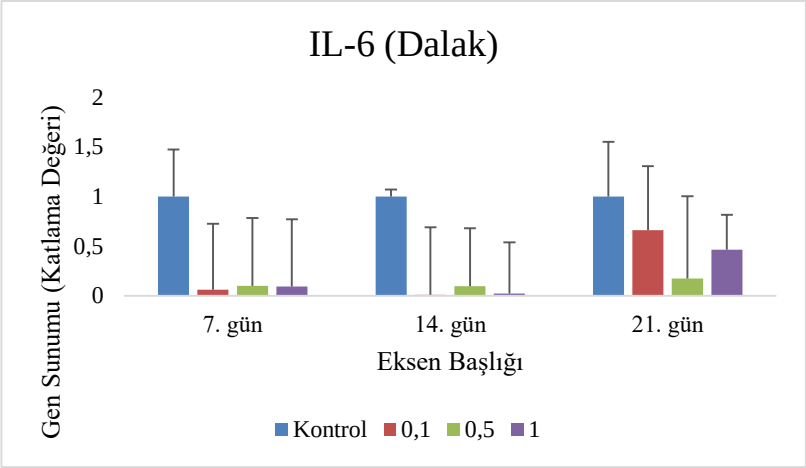
Çubuklardaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıkları gösterir (P <0,05).

4.2.5.2 IL-6

7. günde yapılan örneklemelerde %0,1 konsantrasyonunda üryani eriği sulu metanolik özütü katkılı yem ile beslenen gruplarda IL-6 geninin katlama değerlerinin, bağırsak ve böbrekte diğer gruplara göre önemli derecede artışı söz konusudur (P<0,05). Söz konusu katlama değerleri bağırsakta %0,1, %0,5 ve %1 grupları için sırasıyla 17±0,43, 0,39±0,62 ve 1,4±0,62 iken böbrekte 714,6±0,56, 5,6±0,67 ve 16,4±0,58 olacak şekilde %0,1 grubunun IL-6 geni için katlama değeri farklılığını ortaya koymaktadır (P<0,05) (Şekil 4.6.). IL-6 geninin 14. ve 21. günlerde böbrek ve bağırsaktaki ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında farklılık görülmezken (P>0,05), dalak dokusunda ise söz konusu genin tüm örnekleme zamanlarında deneme gruplarındaki katlama değerlerinin kontrol grubuna göre düşük çıktığı, fakat istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir (P>0,05) (Şekil 4.6).





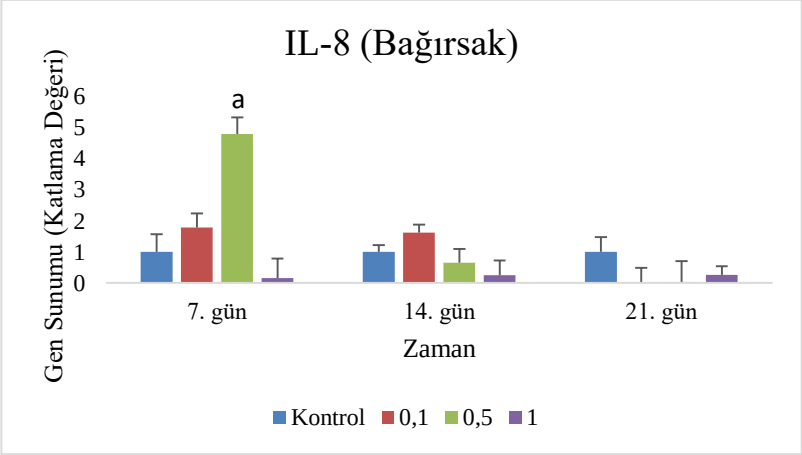


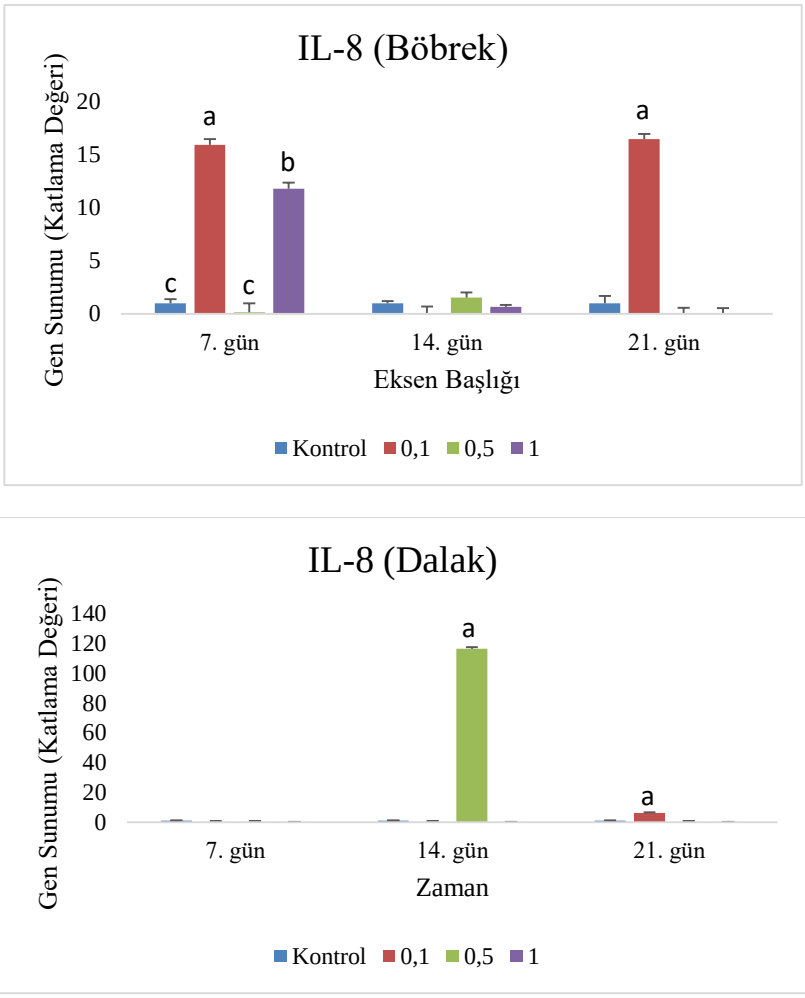
Şekil 4.6 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-6 geninin ekspresyon seviyeleri.

Çubuklardaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıkları gösterir (P <0,05).

4.2.5.3 IL-8

IL-8 geninin 7. günde alınan bağırsak örneklerinde ve 14. günde alınan dalak örneklerinde %0,5'lik gruptaki seviyeleri sırasıyla 4,787±0,53 ve 116,27±1,15 katlama değerleriyle diğer gruplardan yüksek olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Böbrek dokularında ise söz konusu genin %0,1'lik gruptaki katlama değerlerinin 7. günde (15,90±0,54) ve 21. günde (16,44±0,47) kontrol ve diğer gruplara göre önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca %1'lik grubun 7. gündeki gen sunumu seviyesinin (11,76±0,58) de kontrol grubuna (1±0,39) göre yüksek olduğu (P<0,05), fakat diğer örnekleme zamanlarında bu değerin düşüşe geçtiği belirlenmiştir (Şekil 4.7).



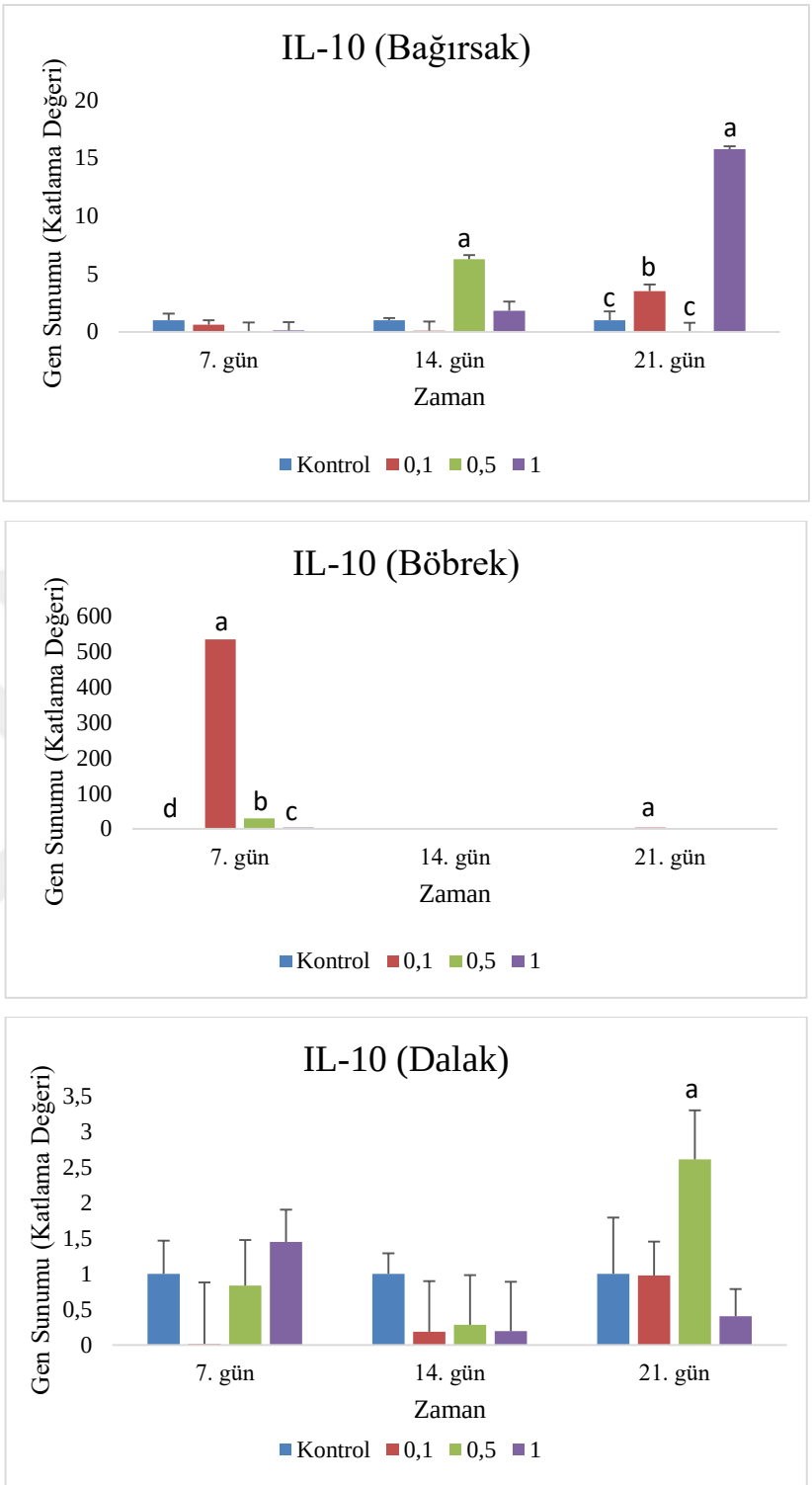


Şekil 4.7 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-8 geninin ekspresyon seviyeleri.

Çubuklardaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıkları gösterir (P <0,05).

4.2.5.4 IL-10

IL-10 gen katlama değerlerinin kontrol ve diğer gruplara göre en yüksek olduğu örnekleme zamanları sırasıyla, bağırsakta 14. gün %0,5'lik grup (6,26±0,36) ve 21. gün %1'lik grup (15,75±0,24); böbrekte 7. gün %0,1'lik grup (534,05±0,51); dalakta ise 21. gün %0,5'lik grup (2,61±0,69) olarak tespit edilmiştir (P<0,05) (Şekil 4.8.).

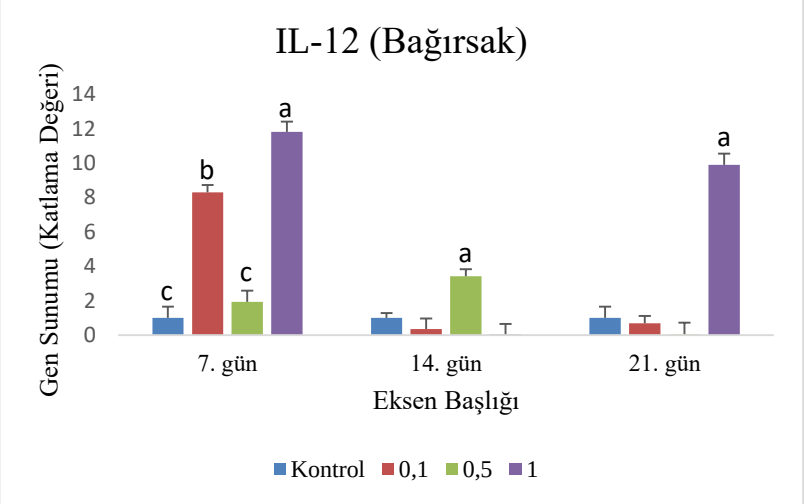


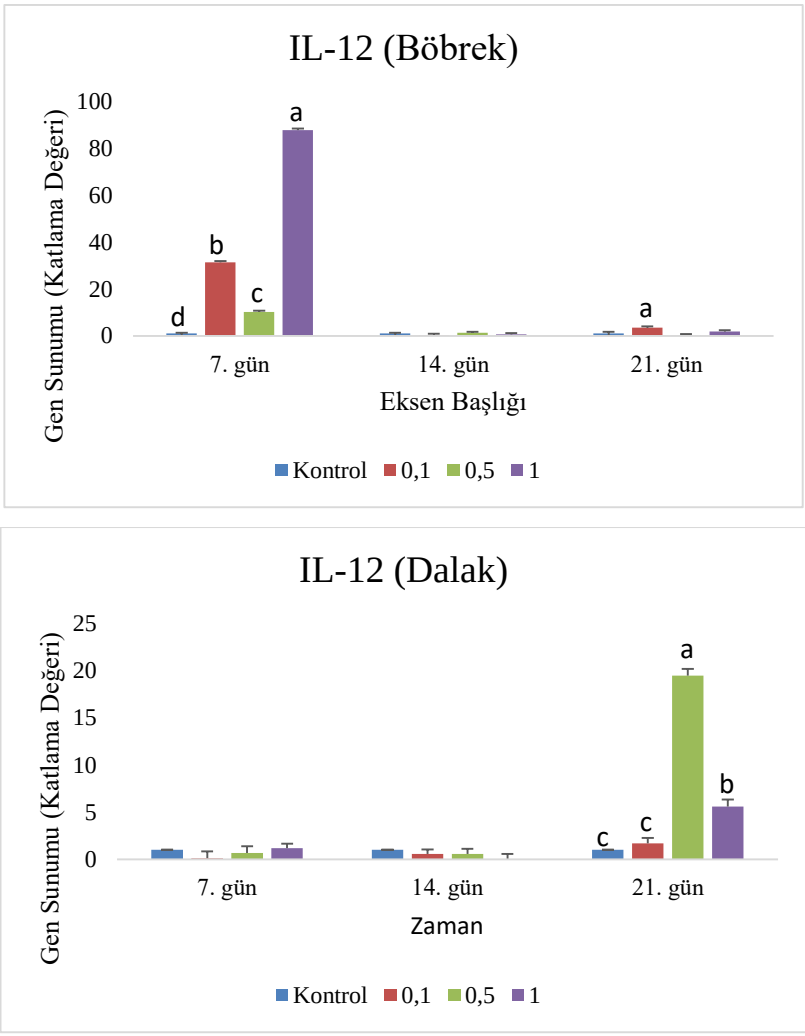
Şekil 4.8 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-10 geninin ekspresyon seviyeleri.

Çubuklardaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıkları gösterir (P <0,05).

4.2.5.5 IL-12

IL-12 geninin bağırsaktaki ekspresyon seviyeleri 7. gün artan doz gruplarına göre (%0,1, %0,5 ve %1) sırasıyla 8,3±0,41, 1,93±0,64 ve 11,81±0,6 iken, 14. gün sırasıyla 0,34±0,61, 3,41±0,41 ve 0,03±0,6; 21. günde ise sırasıyla 0,67±0,43, 0,04±0,68 ve 9,9±0,64 olarak tespit edilmiştir. Bu verilere göre bağırsakta 7. ve 21. günlerde % 1'lik grubun kontrol ve diğer deneme gruplarına göre önemli derecede artış gösterdiği, 14. gün ise %0,5'lik grubun diğer gruplara göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($P<0,05$). Söz konusu gen böbrekteki katlanma değerlerinin 7. günde artan doz gruplarına göre (%0,1,% 0,5 ve %1) sırasıyla 31,33±0,57, 10,22±0,48 ve 87,72±0,57 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre %1'lik grupta diğer gruplara göre en yüksek katlanma değeri gözlenmekte olup, diğer deneme gruplarının yine kontrol grubuna göre önemli derecede artışı söz konusu olmuştur ($P<0,05$). 14. günde böbrekteki gen ekspresyon seviyelerinde gruplara göre herhangi bir farklılık gözlenmezken ($P>0,05$), 21. günde %0,1'lik grubun (3,57±0,44) diğer gruplara göre gen ekspresyonu katlama değeri önemli derecede artmıştır ($P<0,05$). IL-12 geninin dalaktaki ekspresyon seviyeleri 21. gün artan doz gruplarına göre (%0,1,% 0,5 ve %1) sırasıyla, 1,67±0,58, 19,45±0,72 ve 5,6±0,73 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek katlanma değerinin %0,5'lik grupta olduğu, fakat bununla birlikte %1 grubunda yine kontrole kıyasla istatistiksel açıdan artış gösterdiği tespit edilmiştir ($P<0,05$) (Şekil 4.9).



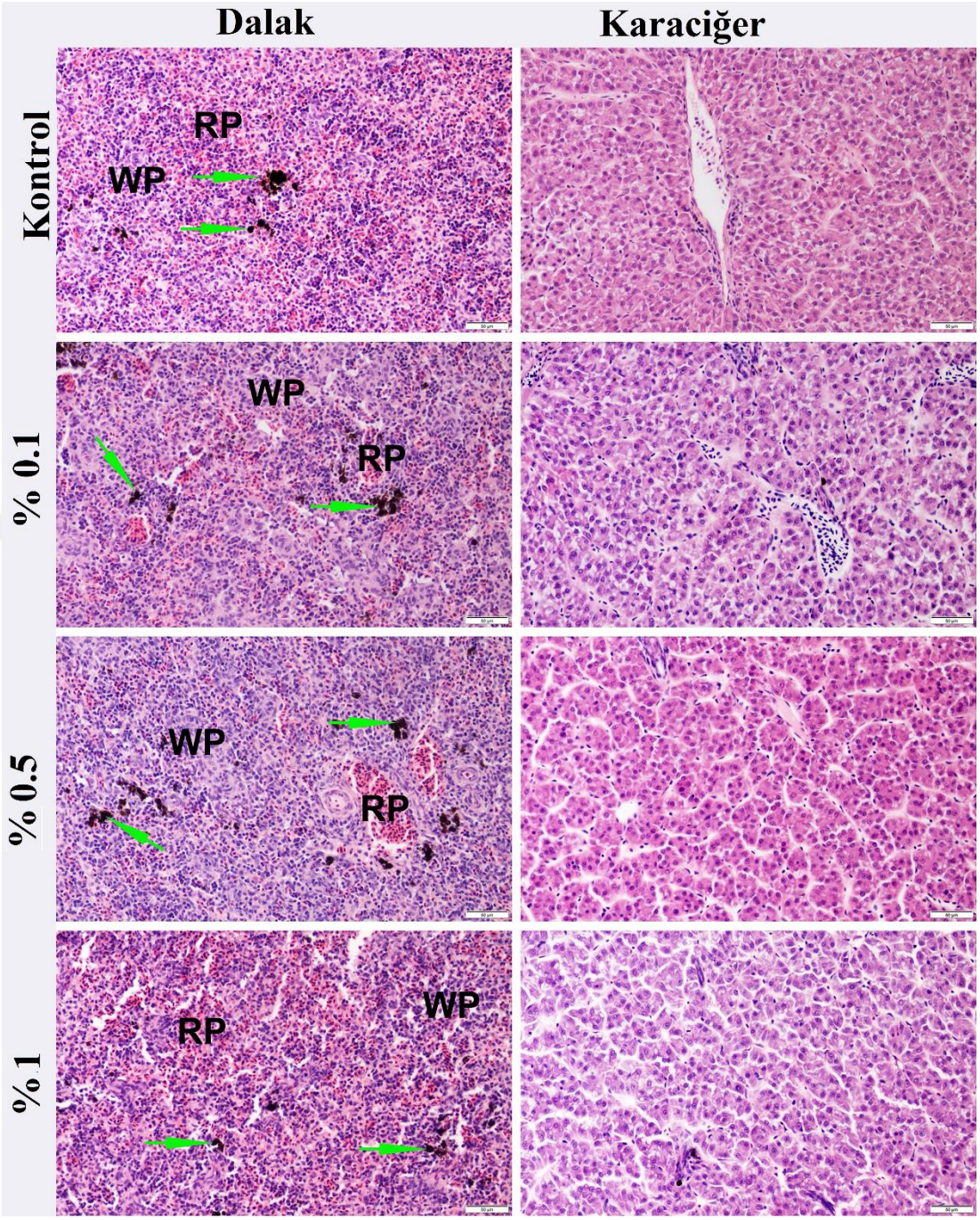


Şekil 4.9 Üryani eriği özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalaklarındaki IL-12 geninin ekspresyon seviyeleri.

Çubuklardaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıkları gösterir (P <0,05).

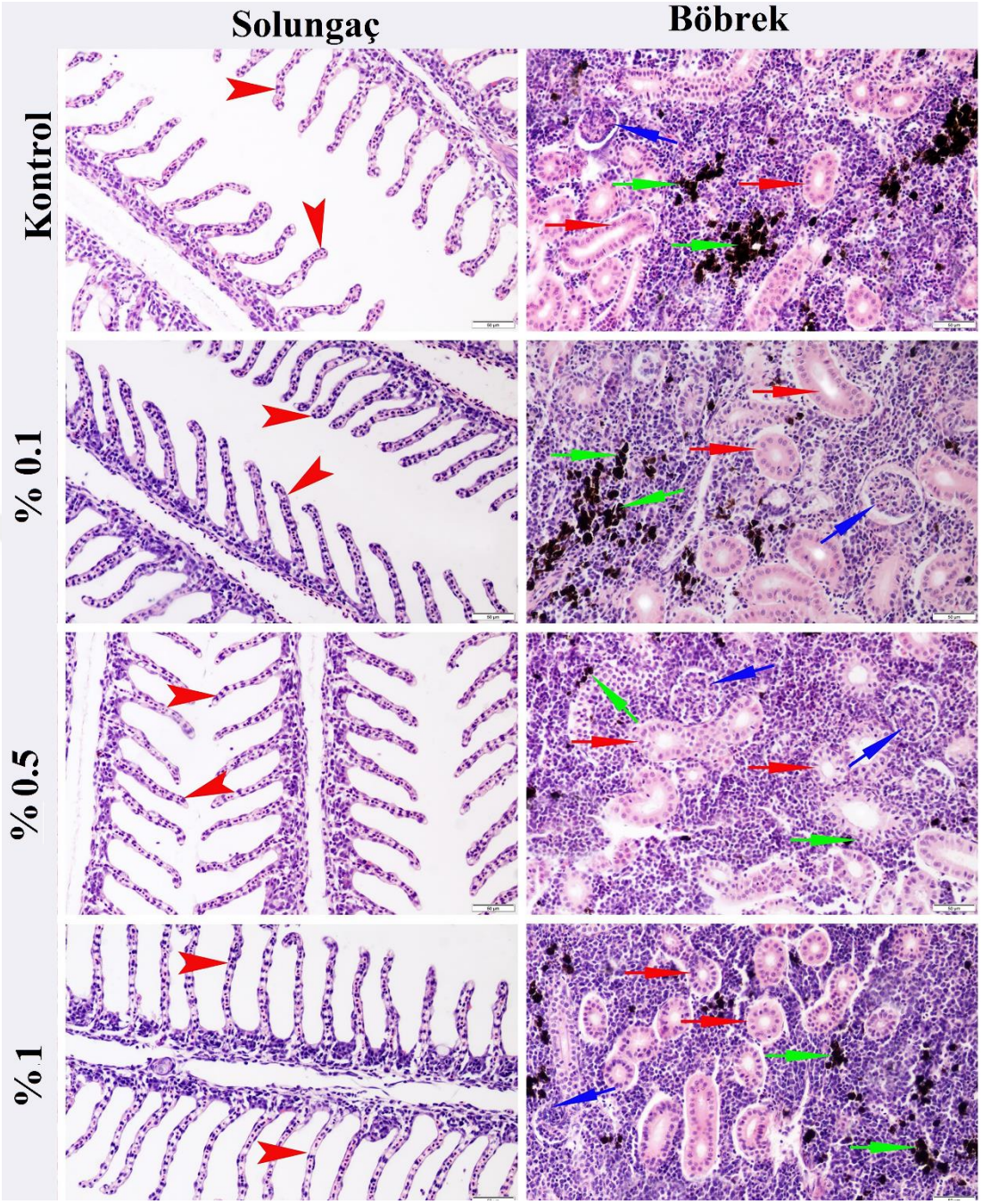
4.3 Histopatoloji Bulguları

Kontrol ve deney gruplarından alınan dokular histopatolojik olarak incelendiğinde dalak dokusunun beyaz ve kırmızı pulpa alanlarının, karaciğer parenşimi ve stromasının, böbrek tubulusları, korpuskulum renalis ve melanomakrofajlarının ve solungaç primer ve sekonder lameller yapılarının normal histolojik yapı gösterdiği belirlenmiştir ve patolojik bir değişime rastlanılmamıştır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Dalak, karaciğer, solungaç ve böbrek kesitlerinin histomorfolojik görünümü.

H&E. WP: Beyaz pulpa, RP: Kırmızı pulpa, Yeşil oklar: Melanomakrofaj, Bar: 50 um.

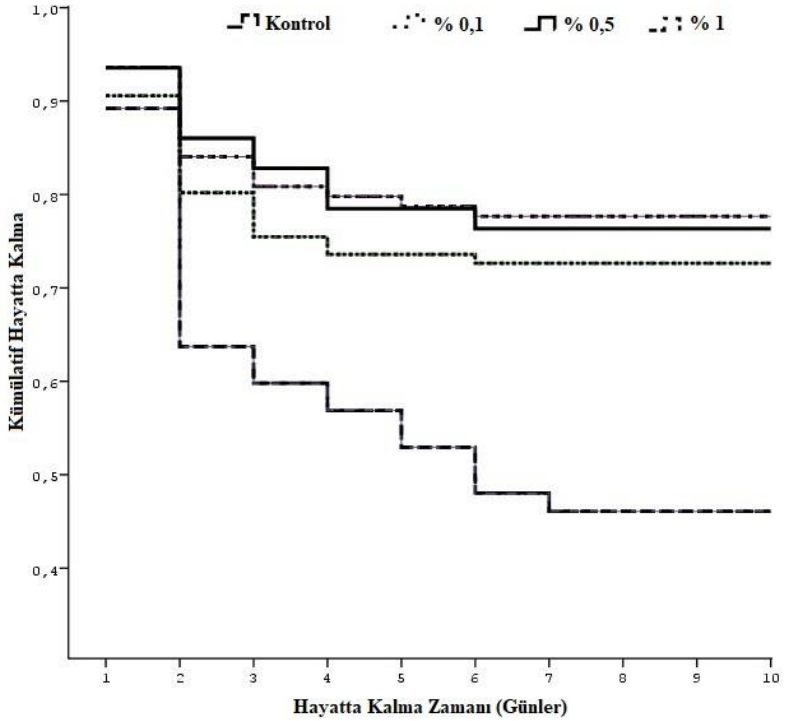


Şekil 4.11. Dalak, karaciğer, solungaç ve böbrek kesitlerinin histomorfolojik görünümü.

H&E.Kırmızı ok başları: Sekonder lameller, Yeşil oklar: Melanomakrofajlar, Kırmızı oklar: Böbrek tubulusları, Mavi oklar: Korpuskulum renalis, Bar: 50 um.

4.4 Kontrol Testi

Çalışmanın 21. gününde balıklara intraperitonal olarak *Yersini ruckeri* bakterisi enjekte edilerek balıkların hayatta kalma oranları 7 gün boyunca kontrol edilmiştir. Çıkan sonuçlarda, artan doz gruplarına göre (%0,1, %0,5 ve %1) sırasıyla hayatta kalma oranlarının %72,81±1,8, %76±0,43 ve %77,68±2,53 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, tüm deneme gruplarının hayatta kalma yüzdelerinin kontrol grubuna (%46,04±1,79) göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (P<0,05) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.12 Deneme sonunda *Yersinia ruckeri* enjekte edilen balıklarda hayatta kalma oranları.

Kontrol, % 0,1, % 0,5 ve % 1, sırasıyla %0, %0,1, %0,5 ve %1 oranında balık yemine katılan özüt dozunu belirtir.

5. TARTIŞMA

Oksidatif radikal üretimi, nötrofiller tarafından oluşturulmuş önemli bir savunma mekanizmasıdır (Anderson vd., 1992). Fagositoz ve solunum patlaması yoluyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin üretimi, balıklarda bakterisidal aktivitenin bir basamağı olup mekanizmaları tam olarak bilinememektedir (Sharp ve Secombes, 1993). Oksidatif radikal üretim miktarı inflamasyonun başlamasında önemli bir rol oynayan oksidatif radikal üretimi ile vücut hücrelerinin özellikle nötrofillerdeki oksidatif radikallerden kaynaklanan aktivitelerinde boyanması ile belirlenir. Bu çalışmada sadece 7. günde %1 oranında üryani eriği ekstraktı uygulanan grubun, kontrole göre oksidatif salınım değerlerinde artış söz konusu olmuştur ($P<0,05$). Benzer şekilde %1 oranında *Aloe vera* ekstraktının gökkuşağı alabalıklarında oksidatif radikal üretimi değerini arttırdığı, fakat bu çalışmadan farklı olarak maksimum aktiviteyi 2. haftada gösterdiği belirtilmiştir (Haghighi vd., 2014). Tetra (*Cotinus coggygria*) ve ebe gümeci (*Malva sylvestris*) bitkisel ekstraktlarının 500 mg kg^{-1} dozlarının sırasıyla levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarında kontrole göre en yüksek oksidatif radikal üretimi değerlerini sağladığı belirtilmiştir (Bilen vd., 2019a). Altunoglu vd. (2017), gökkuşağı alabalıklarında, çörek otunu (*Nigella sativa*) yem katkısı olarak denedikleri çalışmalarında deneme gruplarının oksidatif radikal üretim değerlerinde önemi artışlar tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Bilen vd. (2016b), ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve istiridye mantarının (*Pleurotus ostreatus*) yem katkı maddesi olarak denedikleri çalışmada gökkuşağı alabalıklarında oksidatif radikal üretiminin artışında bu maddelerin önemli etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Yin vd. (2006), *Scutellaria radix* bitkisinin yem katkı maddesi olarak %1 ve %0,5 oranlarında kullanımında oksidatif radikal üretimi azalttığını, %0,1 oranında kullanımı sonucu ise oksidatif radikal üretimi miktarını istatistiksel açıdan önemli olmasa da arttırdığını belirtmişlerdir. Harikrishnan vd. (2009), japon balıklarda (*Carassius auratus*) farklı oranlarda yem katkı maddesi olarak kullanılan bitkisel kaynakların düşük dozunun 30 günde ve orta dozunun ise 20 günde oksidatif radikal üretimi miktarını arttırdığını tespit etmişlerdir. Harikrishnan vd. (2009) bitkisel kaynak kullanım dozunun yüksek oranda tercih edilmesiyle oksidatif radikal üretimi değeri 20 günde artsa da bu artışın diğer konsantrasyon gruplarından

düşük olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar doz ve süre uyumunun önemli olduğunu ve uygun olmaması durumuyla istenmeyen sonuçlar çıkabileceğini belirtmişlerdir (Yin vd., 2006). Ekstrakt içeriği olarak daha etkili olan bazı bitkilerin artan dozlarda balık sağlığına olumsuz yan etkileri görülebilir. Bu nedenle ekstraktların kullanılmadan önce dozunun iyi seçilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada 7. günde bakteriyel öldürme aktivitesinin %1 üryani eriği ekstraktı denenen grupta en yüksek seviyede olduğu ve diğer gruplara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($P<0,05$). Denemenin 14. gününde gruplar arasında bakteriyel öldürme aktivitesi farklılık göstermemiştir ($P>0,05$). 21. günde ise bakteriyel öldürme aktivitelerinin üryani eriği ekstrakt dozu arttıkça kontrol grubuna göre azaldığı fakat kontrol, %0,1 ve %0,5 grupları arasında bu düşüşün önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0,05$). Yılmaz vd. (2018) bakteriyel öldürme aktivitesinin %0,625, %1,25 ve %2,5 oranında keçiboynuzu şurubu içerikli yemlerle beslenen Mozambik tilapya balıklarında kontrole göre önemli derecede arttığını belirtmişlerdir. Bilen vd. (2019a), 500 ve 1000 mg dozunda denedikleri tetra (*Cotinus coggygria*) ve ebe gümeci (*Malva sylvestris*) bitkilerinin çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) 30. ve 60. günlerde bakteriyel öldürme aktivitelerini genellikle arttırdığını belirtmişlerdir.

Lizozim, bakteriyel hücre duvarı peptidoglikanını aktif olarak parçalayan kandaki önemli bir enzim olup kan dolaşımında bulunmanın yanı sıra solungaçlar ve bağırsak sistemi dahil olmak üzere dış çevreye maruz kalan vücut yüzeylerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Kiron, 2012). Lizozim seviyesi veya aktivitesi, balığın doğuştan gelen bağışıklığının önemli bir indeksi olup hem Gr (+) hem de Gr (-) bakterilere karşı aktivite göstermektedir (Saurabh vd., 2008). Bu çalışmanın 7, 14 ve 21. günlerinde deneme gruplarının lizozim aktivitelerinin kontrol grubuna göre önemli bir farklılık göstermemiştir ($P>0,05$). Benzer şekilde, Vazirzadeh vd. (2017), *Ducrosia anethifolia* esansiyel yağlarını yem katkı maddesi olarak denedikleri gökkuşağı alabalıklarında lizozim aktivitelerinin bir değişim göstermediğini bildirirken, Nilavan vd. (2017) ise sazanlarda piperin yem takviyesini denemeleri sonucunda yine benzer bir şekilde lizozim aktivelerinde artış kaydetmediklerini bildirmişlerdir. Zheng vd. (2009), timol ve karvakrol ekstraktları ile timol ve karvakrol karışımlarını *Ictalurus punctatus*'ta

denemişler ve lizozim aktivitesinde bir değişime neden olmadığını ve bakteriyel dirençte artış görülmediğini belirtmişlerdir (Zheng vd., 2009). Fakat bu durumun tersine Altunoglu vd. (2017), çörek otu sulu metanolik özütünü farklı konsantrasyonlarda yem katkı maddesi olarak gökkuşağı alabalıklarında (0,1 ve 0,5 g/kg) denedikleri çalışmalarında lizozim aktivitelerinde artış gözlemlemişlerdir. Tafi vd. (2018), gökkuşağı alabalıklarında *Aloe vera* ekstraktının yem katkı maddesi olarak denemişler ve *A. vera* kullanımının kontrol grubuna kıyasla deneme gruplarında önemli oranda lizozim aktivitesini arttırdığı sonucuna varmışlardır. Bohlouli ve Sadeghi (2016), 0.5, 1 ve 2 g/kg konsantrasyonlarında yeme ilave ettikleri oluklu çakşır (*Ferulago angulata*) otu ekstraktının, 8 hafta süreyle gökkuşağı alabalıklarında deneyerek bazı bağışıklık yanıtlarını incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre tüm deneme gruplarında kontrole göre serum lizozim aktivitesinin artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Diler vd. (2015) pelin otunu (*Artemisia vulgaris*) gökkuşağı alabalıklarında farklı dozlarda (%0, %0,1, %0,5, %1, %2) toz halinde ve etanolik ekstrakt (250 ve 1000 mg/kg) olarak yeme katarak denemişler, sonuç olarak pelin otunun lizozim aktivitesini arttırdığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiğini belirtmişlerdir. Christybapita vd. (2007), yer paskalyası (*Eclipta alba*) yaprağı ekstraktını *Oreochromis mossambicus*'ta %0,01, %0,1 ve % 1 konsantrasyonlarında deneyerek, 2. haftada %1 konsantrasyonun lizozim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir. Bilen vd. (2019b), *Usnea barbata* özütünü denedikleri gökkuşağı alabalıklarında 3. gün ise 4 mg dozunun en yüksek lizozim aktivitesini sağladığını fakat 7. ve 10. günlerde kontrol grubuna göre fark göstermediğini belirtmişlerdir. Zheng vd. (2009), kekik ekstraktının (*Origanum heracleoticum*) kanal kedi balıklarında (*Ictalurus punctatus*) lizozim aktivitesinde yükselme sağladığını bildirirlerken kekik yağının (*Origanum minitiflorum*) yem katkı maddesi denendiği farklı bir çalışmada ise sivri burun karagöz balıklarında lizozim aktivitesinin çalışmanın sonunda kontrole göre artış gösterdiği belirtilmiştir (Karagouni vd., 2005). Bu sonuçlardan farklı olarak *Withania somnifera*, *Ocimum sanctum* ve *Myristica fragrans* bitkilerinin yem katkı maddesi olarak denendiği lahoz (*Epinephelus tauvina*) balıklarında lizozim aktivitesini arttırmadığı bildirilmiştir (Sivaram vd., 2004). Bu duruma benzer şekilde bel bitkisinin (*Aegle marmelos*) mozambik tilapya balıklarında (*Oreochromis mossambicus*) lizozim aktivitesine bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (Immanuel vd., 2009). Amhamed vd. (2018), sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında

yem katkı maddesi olarak denedikleri kazayağı (*Chenopodium albüm*) sulu metanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (0,01, 0,05 ve 0,1 g/kg) 15. günde kontrol grubuna kıyasla lizozim seviyesini arttırırken, 30. günde sadece 0,1 g/kg dozunun artış sağladığını fakat 30. günde tüm gruplar arasında herhangi bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir.

Myeloperoksidaz makrofajları ve nötrofilleri uyaran önemli bir enzim olup, hücrelerden H_2O_2 salınımını hızlandırmaktadır (Grattendick vd., 2002; Lau vd., 2005) . Çalışmanın 14. gününde myeloperoksidaz aktiviteleri incelendiğine deneme gruplarının myeloperoksidaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede artış gösterdiği ($P<0,05$), fakat 7. ve 21. günlerde deneme ve kontrol gruplarının arasında herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Bilen vd. (2016b), bu çalışmanın 14. gününde elde edilen sonuçlara benzer şekilde kavak mantarı ve ısırgan otu katkılı yemlerin gökkuşağı alabalıklarında MPO etkinliği açısından tüm deneme gruplarında kontrole göre artış sağladığını belirtmişlerdir ($P<0,05$). Christybapita vd. (2007), mozambik tilapyasında (*Oreochromis mossambicus*), 0,01, 0,1, 1 g/100g konsantrasyonlarında denedikleri yer paskalyası (*Eclipta alba*) ekstraktının; Kirubakaran vd. (2010) yine aynı balık türünde ve aynı dozda denedikleri *Nyctanthes arbortristis* tohumu ekstraktının deneme gruplarında myeloperoksidaz aktivitelerini arttırdığını belirtmişlerdir. Bilen vd. (2019b), *Usnea barbata* sulu metanolik özütünün 3. gün 4 ve 12 mg; 7. gün 12 mg ve 10. gün ise 4 ve 8 mg olan dozlarının kontrol grubuna göre myeloperoksidaz aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir. Altunoglu vd. (2017), gökkuşağı alabalıklarında çörekotunu (*Nigella sativa*) yem katkısı olarak 30 gün süreyle denedikleri çalışmalarında, 0,1 ve 0,5 g/kg konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre myeloperoksidaz aktivitelerinde artış sağladığını belirtmişlerdir. Bilen vd. (2016a), benzer şekilde gökkuşağı alabalıklarında 0,1 ve 0,5 g/kg dozunda denedikleri gebre otunun (*Capparis spinosa*), 0,1 g/kg konsantrasyonunun 30 gün sonunda myeloperoksidaz aktivitesini en yüksek değere yükselttiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan farklı olarak Christybapita vd. (2007), *Eclipta alba* ekstraktı katkılı yemlerle besledikleri tilapyalarda (*Oreochromis mossambicus*) myeloperoksidaz düzeylerinde herhangi bir değişim tespit etmemişlerdir. Bilen vd. (2020), 0,1, 0,5 ve 1 g/kg konsantrasyonlarında denedikleri limon otu (*Melissa officinalis*) özütünün yeme ilavesi sonucunda

gökkuşağı alabalıklarında myeloperoksidaz aktivitesini kontrol grubuna göre düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Amhamed vd. (2018), sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında 0,01, 0,05 ve 0,1 g/kg konsantrasyonlarında denedikleri kazayağı (*Chenopodium albüm*) sulu metanolik ekstraktının myeloperoksidaz aktivitesini tüm deneme gruplarında 15, 30 ve 45. günlerde kontrol grubuna göre arttırdığını bildirmişlerdir.

Doğuştan gelen ve bağışıklığı düzenleyen sitokinler hasar görmüş hücreler tarafından mikrobiyal antijenlere karşı yanıt olarak üretilmektedirler (He vd., 2013). IL-1β önemli bir proinflamatuar sitokin olup, mikrobiyal saldırıda, doku hasarında ve immunolojik reaksiyonlarda konakçının yanıtı olarak işlev görmektedir (Dinarello ve Giamila, 2003; Corripio-Miyar vd., 2013). Bu çalışmada böbrek ve dalakta IL-1β gen sunumu katlama değerlerinde özellikle 7. ve 21. günlerde artışlar tespit edilmiştir. IL-6 T-yardımcı hücrelerini, makrofaj farklılaşmasını ve B-hücrelerinin olgunlaşmasını aktifleştirerek, bağışıklık sistemi düzenleyici bir rol üstlenmektedir (Diehl ve Rincon, 2002). Øvergård vd. (2012), IL-6'nın bir pleiotropik sitokin olduğunu ve akut faz reaksiyonu ve hematopoez gibi süreçlerde düzenleyici bir rol oynadığını belirtmiştir. Üryani eriğinin sadece %0,1'lik konsantrasyonunun gökkuşağı alabalıklarında IL-6 geninin katlanma değerini 7. günde böbrekte ve bağırsakta kontrol grubuna göre arttırdığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). Bu genin dalaktaki ekspresyonunda ise deneme ve kontrol grupları arasında fark görülmemiştir ($P>0,05$). Diğer bir proinflamatuar sitokin olan IL-8 nötrofillerin, T-lenfositlerin ve bazofileri uyararak inflamatuar yanıtın aktivasyonunda rolü vardır (Seppola vd., 2008). Bu çalışmada IL-8 geninin bağırsakta sadece 7. günde %0,5 grubunda katlanma değerinde artış görülürken, böbrekte özellikle %0,1'lik grupta artışı söz konusu olmuştur ($P<0,05$). Ayrıca IL-8 geninin dalakta 14. ve 21. günlerde sırasıyla % 0,5 ve % 0,1 konsantrasyonlarında katlanma değerlerinde artış görülmüştür ($P<0,05$). *Usnea barbata* sulu metanolik özütünün farklı konsantrasyonlarının IL-6 ve IL-8 gökkuşağı alabalığı sitokinleri üzerinde 0, 3 ve 12. günlerde artış sağlarken; IL-10 ve IL-12 sitokinleri için 10. günde kontrol grubuna göre önemli artış gösterdiği belirtilmiştir (Bilen vd., 2019b). IL-10, proinflamatuar sitokinlerin üretimini baskılayan bir anti-inflamatuar sitokindir (Savan vd., 2003). IL-10'un, makrofajlar ve T, B ve NK hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre popülasyonları tarafından üretilen ve bunları etkileyen çok yönlü bir sitokin

olduğu belirtilmiştir (Harun vd., 2011). Bu çalışmada bağırsakta %0,5'lik grupta 14. gün, %0,1 ve %1'lik gruplarda ise 21. günde IL-10 geninin katlanma değerlerinde artış görülmüştür (P<0,05). %0,1'lik grubun böbrek dokusunda 7. günde kontrole ve diğer gruplara göre önemli bir ekspresyon seviyesi söz konusu iken, dalakta 21. günde bu artışa benzer durum %0,5'lik grupta gözlenmiştir (P<0,05). IL-12, virüslere ve parazitlere karşı bağışıklık aktivitesini başlatmak için hücre aracılı bağışıklık tepkisini sağlayan düzenleyici bir sitokindir (Bilen ve Elbeshti, 2019). IL-12 geninin bağırsakta ve böbrekteki ekspresyon seviyeleri özellikle 7. günde, %0,1 ve %1'lik gruplarda kontrol grubuna göre katlanma değerindeki önemli artışla kendisini göstermiştir (P<0,05). Söz konusu genin dalaktaki ekspresyon seviyelerine bakıldığında sadece 21. günde %0,5 ve %1 konsantrasyonlarındaki gruplarda kontrol grubuna göre önemli bir artış söz konusu olmuştur (P<0,05). Tetra *Cotinus coggygria*) özütünün gökkuşağı alabalıklarının sitokin yanıtlarında meydana getirdiği değişimlerin incelendiği araştırmada IL-1β ve IL-6 için özellikle 3. günde 4 ve 8 mg'lık konsantrasyonlarda; IL-8, IL-10 ve IL-12 genleri için ise 3. günde özellikle 8 mg'lık grubun kontrole göre artış görüldüğü bildirilmiştir (Bilen ve Elbeshti, 2019).

Bu çalışmada 21 günün sonunda *Y. ruckeri* ile balıklar kontrol testine tabi tutulmuş olup tüm deneme gruplarının hayatta kalma yüzdelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). *Usnea barbata* özütünün *L. garvieae*'ye karşı karşı 4 ve 8 mg dozlarında gökkuşağı alabalıklarının yemine ilave edilmesi sonuçlarında, yaşama oranlarının kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Bilen vd., 2019b). Bilen ve Elbeshti (2019) tarafından tetra özütünün 8 ve 12 mg'lık konsantrasyonlarının gökkuşağı alabalıklarının *A. hydrophila* bakterisine karşı yaşama oranını arttırdığı belirtilmiştir. Bilen vd. (2018), dereotu (*Anethum graveolens*) ve bahçe teresi (*Lepidium sativum*) metanolik ekstraktlarını 1 ve 2 g/kg konsantrasyonlarında yeme ilave ederek sazanlarda *A. hydrophila* bakterisine karşı yaşama oranlarını kontrol testine tabi tuttukları çalışmalarında, 2 g/kg bahçe teresi ve 1 g/kg dere otunun balıklarda yaşama oranını arttırdığını belirtmişlerdir. Bilen vd. (2019a), 500 ve 1000 mg dozunda denedikleri tetra (*Cotinus coggygria*) ve ebe gümeci (*Malva sylvestris*) bitkilerinin çipura ve levrek balıklarında *V. anguillarum* enfeksiyonuna karşı yaşama oranını önemli derecede arttırdığını belirtmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Su ürünleri yetiştiriciliği çalışmalarında bağışıklık hızlandırıcı kullanımı her geçen gün önemini arttırmaktadır. Özellikle organik ürün yetiştirme çalışmalarında hastalıklara karşı doğal yollarla koruma sağlayarak, antibiyotik ve kimyasal kullanımını en az düzeye indirme çabaları her geçen gün daha büyük bir önem kazanmaktadır.

Üryani eriği sulu metanolik özütünün gökkuşağı alabalıklarının yemlerine ilave edilmesi ve 3 hafta boyunca balıkların bu yemlerle beslenmesi neticesinde elde edilen bulgulara göre balıkların büyüme performanslarında olumlu ya da olumsuz herhangi bir etki tespit edilememiştir. Balıkların bağışıklık sistemi ile ilgili yapılan analizlerin neticesinde ise, genellikle çalışmanın 7. gününde tüm bağışıklık parametrelerinde artış olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Deneme sonunda balıkların solungaç, karaciğer, böbrek ve dalak doku örneklerinde histopatolojik olarak incelendiğinde herhangi bir olumsuz bulgu tespit edilmemiştir. Buna ek olarak çalışma sonunda balıklar *Yersinia ruckeri* bakterisi ile enfekte edildiğinde deneme gruplarının yaşama oranlarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, üryani eriği sulu metanolik özütün yem katkı maddesi olarak kullanımının, gökkuşağı alabalıklarının bağışıklık sisteminde olumlu etkiler sağladığı ve yersiniozis (enterik kızılağız) hastalığına karşı koruyucu özelliği olduğu tespit edilmiştir. Bahsi geçen bu avantajlar ışığında, üryani eriğinin bağışıklık uyarıcı olarak gökkuşağı alabalıklarında kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2007). Temel İmmünoloji, İstanbul Medikal Yayıncılık, editörler: Prof. Dr. Yıldız Camcıoğlu, Prof. Dr. Günnur Deniz. 1-223 s.

Akkan, T., Kaya, A., & Dinçer, S. (2015). Balık çiftliklerinin ekolojik tahribatına bir örnek: bakterilerdeki antibiyotik dirençliliğine etkileri, İskenderun Körfezi. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(1), 20-27.

Alsop D. H., & Wood C. M. (1997). The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 200, 2337–2346.

Altun S., & Diler Ö. (1999). *Yersinia ruckeri* ile infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) hematolojik incelemeler. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 301-309.

Altunoglu, Y. C., Bilen, S., Ulu, F., & Biswas, G. (2017). Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 103–109.

Aly, S. M., Atti, N. M. A., & Mohamed, F. M. (2008). Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. 8th international symposium on Tilapia in aquaculture. Cairo, Egypt, 277-295.

Amhamed, I. D., Mohamed, G. A., Almabrok, A. A., Altief, T. A. S., & Bilen, S. (2018). Efficacy of dietary *Chenopodium album* extract on some health parameters, digestive enzymes and growth performance in juvenile *Cyprinus carpio*. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*, 33(2), 165-176.

Anderson, D. P., Moritomo, T., & Grooth, R. (1992). Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30(4), 419-429.

Arda, M., Seçer, S., & Sarıeyyüpoğlu, M. (2002). Balık Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara, 1-36 s

Ashley, P. J. (2007) Fish welfare: current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science, Fish Behavior and Welfare, 104, 199–235.

Awad, E., Mitchell, W. J., & Austin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 34(8), 629-634.

Bilen, S., & Elbeshti, H. T. A. G. (2019). A new potential therapeutic remedy against *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using tetra, *Cotinus coggygria*. *Journal of Fish Diseases*, 42(10), 1369-1381.

Bilen, S., Altief, T. A. S., Özdemir, K. Y., Salem, M. O. A., Terzi, E., & Güney, K. (2020). Effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) extract on growth performance, digestive and antioxidant enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46, 471-481.

Bilen, S., Altunoglu, Y. C., Ulu, F., & Biswas, G. (2016a). Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 206-212.

Bilen, S., Kenanoglu, O. N., Terzi, E., Ozdemir, R. C., & Sonmez, A. Y. (2019a). Effects of tetra (*Cotinus coggygria*) and common mallow (*Malva sylvestris*) plant extracts on growth performance and immune response in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) and European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 734251.

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.

Bilen, S., Sirtiyah, A. M. A., & Terzi, E. (2019b). Therapeutic effects of beard lichen, *Usnea barbata* extract against *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 401-409.

Bilen, S., Soydaş, E., & Bilen, A. (2014). Isırgan otunun (*Urtica dioica*) metanolik özütünün japon balıklarının (*Carassius auratus*) doğal olmayan bağışıklık yanıtı üzerine etkileri. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*, 27(2), 24-29.

Bilen, S., Ünal, S., & Güvensoy, H. (2016b). Effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and nettle (*Urtica dioica*) methanolic extracts on immune responses and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 454, 90-94.

Bilen, S., Yılmaz, S., & Bilen, A. M. (2013). Influence of tetra (*Cotinus coggygria*) extract against *Vibrio anguillarum* infection in koi carp, *Cyprinus carpio* with reference to haematological and immunological changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(3), 517-522.

Bohlouli, S., & Sadeghi, E. (2016). Growth performance and haematological and immunological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings

supplemented with dietary *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. *Acta Veterinaria Brno*, 85, 231- 238.

Boran, H., Terzi, E., Altinok, I., Capkin, E., & Bascinar, N. (2013). Bacterial diseases of cultured mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages, *Aquaculture*, 396(399), 8-13.

Brattgjerd, S., & Evensen, Ø. (1996). A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary Pathology*, 33(1), 55-65.

Bureau, D. P., Kaushik, S. J., & Cho, C. Y. (2002). Bioenergetics. In: Halver J.E., Hardy R. W., Eds. Fish Nutrition 3rd ed. Academic Press. 1-59.

Capkin, E., Terzi, E., & Altinok, I. (2015). Antibiotic resistance gene occurrence in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 114, 127-137.

Chettri, J. K., Raida, M. K., Holten-Andersen, L., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2011). PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 35(4), 476-482.

Christybapita, D., Divyagnaneswari, M., & Michael, R. D. (2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(4), 840-852.

Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Tsamopoulos, K., & Secombes, C. J. (2007). Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1ß and IL- 8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Molecular Immunology*, 44, 1361e1373.

Cuesta, A., Ortuño, J., Rodriguez, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2002). Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(4), 279-291.

Çek, Ş., Turan, F., & Atik, E. (2007). Masculinization of convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) by immersion in *Tribulus terrestris* extract. *Aquaculture International*, 15(2), 109-119.

Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K., & Bøgwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 241-273.

Davis, K. B., Griffin, B. R., & Gray, W. L. (2002) Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to (*Ichthyophthirius multifiliis*) and channel catfish (virus infection). *Aquaculture*, 214, 55–66.

Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, black cumin and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 101-109.

Diab, A. S., Aly, S. M., John, G., Abde-Hadi, Y., & Mohamed, M. F. (2008). Effect of garlic, black seed and biogen as immunostimulants on the growth and Survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae), and their response to artificial infection with *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Aquatic Science*, 33(1), 63–68.

Diehl, S., & Rincon, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*, 39(9), 531–536.

Diker K. S. (2005). İmmunoloji (2. Baskı), Medisan, Ankara. 304 p.

Diler, Ö., Atabay, A., & Görmez, Ö. (2017). Bitkisel katkı maddesi Artemisia vulgaris' in gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhyncus mykiss*, Walbaum) büyüme performansı ve antioksidan aktivite üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 13(2), 119-131.

Diler, Ö., Görmez, Ö., Terzioğlu, S., & Atabay, A. (2015). Pelin otu (*Artemisia vulgaris* L)'nun gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) hastalıklara karşı direnç ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine etkisi. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 4(1), 1-11.

Dinarello, C. A., & Giamila, F. (2003). Interleukin-18 and host defense against infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 187, 370-384.

Divyagnaneswari M., Christybapita D., & Dinakaran M. R. (2007). Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* Leaf Fractions. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 249-259.

Dorucu, M., Ozesen Colak, S., Ispir, U., Altinterim, B., & Celayir, Y. (2009). The effect of black cumin seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 2(1), 27-33.

Dügenci, S. K., Arda, N., & Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 99–106.

Ellis, A. E. (1990). Lysozyme assays. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D.P.

Grattendick, K., Stuart, R., Roberts, E., Lincoln, J., Lefkowitz, S. S., Bollen, A., & Lefkowitz, D. L. (2002). Alveolar macrophage activation by myeloperoxidase: a model for exacerbation of lung inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26, 716-722.

Haghighi, M., Sharif Rohani, M., Samadi, M., Tavoli, M., Eslami, M., & Yusefi, R. (2014). Study of effects Aloe vera extract supplemented feed on hematological and immunological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research,* 2(6), 2143-2154.

Harikrishnan R., Balasundaram C., Moon Y. G., Kim M. C., Kim J. S., & Heo, M. S. (2009). Use of herbal concoction in the therapy of goldfish (*Carassius auratus*) ınfected with *Aeromonas hydrophila*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53: 27-36.

Harun, N. O., Costa, M. M., Secombes, C. J., & Wang, T. (2011). Sequencing of a second interleukin-10 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and comparative investigation of the expression and modulation of the paralogues in vitro and in vivo. *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 107-117.

He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z., & Yao, B. (2013). Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀× *Oreochromis aureus*♂. *Aquaculture*, 412, 125-130.

Hirsch, R., Terns, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999). Occurence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225, 109–118.

Hoşsu, B., Korkut, A. Y., & Fırat, A. (2003). Balık Besleme ve Yem Teknolojileri 1 (Balık Besleme Fizyolojisi ve Kimyası) 3. Baskı. Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, 276 p.

Immanuel, G., Uma, R. P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Punitha, P. S. M., Michael, B. 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.

Jobling, M. (1996). Environmental Biology of Fishes 2nd Ed. Chapman and Hall London. 455 p.

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(3-4), 215-228.

Karataş, S., Candan, A., & Demircan, D. (2004). Enteric red mouth disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the Black Sea coast of Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 56: 226-231.

Kav, K., & Erganis, O. (2008). Balıklarda Bağışıklık Sistemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 24,1;97-106.

Keser, O., & Bilal, T. (2008). Beta-glukanın hayvan beslemede bağışıklık sistemi ve performans üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5(2), 107-119.

Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 111–133.

Kirubakaran C. J. W., Palexander C., & Michael R. D. (2010). Enhancement of non-specific immune responses and disease resistance on oral administration of *Nyctanthes arbortristis* seed extract in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research*, 41, 1630-1639.

Komatsu, K., Tsutsui, S., Hino, K., Araki, K., Yoshiura, Y., Yamamoto, A., & Watanabe, T. (2009). Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in response to bacterial infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 499-506.

Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46(1), 103.

Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J. P., Freeman, B. A., Daiber, A., Gehling, U. M., & Meinertz, T. (2005). Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(2), 431-436.

Logambal S. M., Venkatalakshmi S., & Michae R. D. (2000). Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia*, 430, 113–120.

Mesalhy, S., Mohammed, M. F., & John, G. (2008). Echinacea as immunostimulatory agent in nile tilapia *(Oreochromis niloticus)* via earthen pond experiment. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo, Egypt, 1033-1042.

Nilavan, E. S., Raman, R. P., Srivastava, P. P., Basha, K. A., Kumar, K., Kumar, A., & Kumar, S. (2017). Dietary piperine improves haemato-immunological parameters, growth profiles and resistance against *Aeromonas hydrophıla* in

Labeo rohita (Hamilton, 1822). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 32, 189-203.

Noguchi, G. E. (1998). Immunological disorders associated with polychlorinated biphenyls and related halogenated aromatic hydrocarbons. In: Leatherland, J.F., Woo, P.T.K. Eds. Fish Diseases and Disorders. CAB International, 163-186.

Nya, E. J., & Austin, B. (2009). Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 32(11), 963-970.

Nya, E. J., Dawood, Z., & Austin, B. (2010). The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33(4), 293-300.

Nya, E. J. (2009). Studies on Dietary Supplements for the Control of *Aeromonas hydrophila* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). (Doktora Tezi). School of Life Sciences, Heriot Watt University, Edinburgh, UK.

Okumuş, İ. (2002). Rainbow trout broodstock management and seed production in Turkey: Present practices, constraints and the future. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2(1), 41-56.

Olsen, R. L., & Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 120-128.

Øvergård, A. C., Nepstad, I., Nerland, A. H., & Patel, S. (2012). Characterization and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1β, IL-6, IL-11, IL-12β and IFNγ. *Molecular Biology Reports*, 39, 2201-2213.

Pasnik, D. J., Evans, J. J., Panangala, V. S., Klesius, P. H., Shelby, R. A., & Shoemaker, C. A. (2005) Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases*, 28, 205–212.

Pennell, W., & Barton, B. A. (1996). Principles of salmonid culture. Elsevier.

Poppenga, R. H. (2002). Herbal medicine: potential for intoxication and interaction with conventional drugs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17, 6–18.

Pouliquen, H., & Le Bris, H. (1996). Sorption of oxolinic acid and oxytetracycline to marine sediments. *Chemosphere*, 33, 801–815.

Pratap, H. B., & Wendelaar Bonga, S. E. (1993). Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na+/K+-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquatic Toxicology,* 26(1-2), 133-149.

Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318.

Quade, M. J., & Roth, J. A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(3-4), 239-248.

Raida, M. K., Holten-Andersen, L., & Buchmann, K. (2011). Association between *Yersinia ruckeri* infection, cytokine expression and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30(6), 1257-1264.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn P. (2009a). Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in tilapia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 2085–2089.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn P. (2009b). Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infecting nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 579-582.

Ricker, W. E. (1979). Growth rates and models. In: Hoar, W. S., Randall, R. J., Brett, J. R. (Eds.), Fish Physiology, vol. 8. Academic Press,New York, pp. 677–743.

Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology,* 31(5), 616-626.

Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39, 223–239.

Savan, R., Igawa, D., & Sakai, M. (2003). Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. *European Journal of Biochemistry*, 270(23), 4647-4654.

Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. The fish immune system: organism, pathogen and environment, 15, 63-103.

Seppola, M., Larsen, A. N., Steiro, K., Robertsen, B., & Jensen, I. (2008). Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 beta, IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Molecular Immunology*, 45(4), 887–897.

Sharp, G. J. E., & Secombes, C. J. (1993). The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 3(2), 119-129.

Sigh, J., Lindenstrøm, T., & Buchmann, K. (2004). Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(1), 75-86.

Sivaram, V., Babu, M. M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T., & Marian M. P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237, 9-20.

Siwicki A. K., & Anderson D. P. (1993b). Nonspecific defense mechanisms assay in fish: ii. potential killing activity of neutrophils and macrophages lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Disease Diagnosis and Prevention Methods. FAO-project GCP/INT/JPA IFI Olsztyn Poland pp. 105–112.

Siwicki, A. K., & Anderson, D. P. (1993a). Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. *US Fish Wild Service*, 1, 1-17.

Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 165-175.

Sönmez, A. Y., Özdemir, R. C., Bilen, S., & Yürüten Özdemir, K. (2018). Cyclopamine induced expression of immune-related genes in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) head kidney leukocytes. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 70, 1-8.

Tafi, A. A., Meshkini, S., Tukmechi, A., Alishahi, M., & Noori, F. (2018). Immunological and antistreptococcal effects of *Salvia officinalis* and *Aloe vera* extracts supplemented feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(3), 365-370.

Terzi, E. (2018). Determination of antimicrobial resistance profiles of the bacteria isolated from cultured sturgeons. *Menba Journal of Fisheries Faculty*, 4(2), 7-13.

Terzi, E., Corum, O., Bilen, S., Kenanoglu, O. N., Atik, O., & Uney, K. (2020). Pharmacokinetics of danofloxacin in rainbow trout after different routes of administration. *Aquaculture*, 734984.

Tidwell, J. (2012). Aquaculture Production Systems. John Wiley and Sons.

Timur, G., & Timur, M. (2003). Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayın No:5: 538: İstanbul.

Tort, L., Balasch, J. C., & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22, 277–286.

URL-1. Ala erik (üryani eriği), www.kastamonu.tarimorman.gov.tr Erişim Tarihi; 18/02/2020.

Vazirzadeh, A., Dehghan, F., & Kazemeini, R. (2017). Changes in growth, blood immune parameters and expression of immune related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Fish & Shellfish Immunology*, 69, 164-172.

Wu, C. C., Liu C. H., Chang Y. P., & Hsieh S. L. (2010). Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immuneresponse and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 258-263.

Yılmaz, S., Ergün, S., & Çelik, E. Ş. (2018). The effect of dietary carob (*Ceratonia siliqua*) syrup on growth performance, haematological, serum biochemical and immunological parameters in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(12), 1820-1826.

Yin G., Jeney G., Racz T., Xu P., Jun X., & Jeney Z. (2006). Effect of two chinese herbs 198 (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 253: 39-47.

Zapata, A., & Amemiya, C. T. (2000). Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. in origin and evolution of the vertebrate immune system (pp. 67-107). Springer, Berlin, Heidelberg.

Zheng Z. L., Tan J. Y. W., Liu H. Y., Zhou X. H., Xiang X., & Wang K. 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, 214-218.

Zilberg D., Tal A., Froyman N., Abutbul S., Dudai N., & Goldhirsh A. G. (2010). Dried leaves of *Rosmarinus officinalis* as a treatment for Streptococcosis in tilapia. *Journal of Fish Diseases*, 33, 361-369.

8. ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı	: Bünyamin KÜÇÜKÖŞKER
Doğum Yeri ve Yılı	: Kadirli/1978
Medeni Hali	: Bekar
Yabancı Dili	: İngilizce
E-posta	: bunyamin.kucukkosker@tarimorman.gov.tr

Eğitim Durumu

Lise	: Halkalı Ziraat Meslek Lisesi, 1996
Lisans	: Sinop Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 2017
Yüksek Lisans	: Kastamonu Üniversitesi, 2017-Devam Ediyor

Mesleki Deneyim

İş Yeri	: Tarım ve Orman Bakanlığı, 1998-Devam Ediyor