

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevkan ÖZÜTOK

**ZENCEFİL (*Zingiber officinale* Roscoe) KATKILI YEMLERİN NİL TİLAPİA
(*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758)'LARINDA İMMÜNOSTİMÜLANT
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZENCEFİL (*Zingiber officinale* Roscoe) KATKILI YEMLERİN NİL TİLAPİA
(*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758)'LARINDA İMMÜNOSTİMÜLANT
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevkan ÖZÜTOK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

Bu Tez 16/12/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Yrd. Doç. Dr. Aysel ŞAHAN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
ÜYE

.....
Yrd.Doç. Dr. Sibel ÖZESEN ÇOLAK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Yetiştiricilik Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: SÜF2010YL21

Not:Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZENCEFİL (*Zingiber officinale* Roscoe) KATKILI YEMLERİN NİL TİLAPİA (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758)' LARINDA İMMÜNOSTİMÜLANT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevkan ÖZÜTOK

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI**

Danışman :Yrd. Doç. Dr. Aysel ŞAHAN

Yıl: 2011, Sayfa:51

Jüri :Yrd. Doç. Dr. Aysel ŞAHAN

:Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER

:Yrd. Doç. Dr. Sibel ÖZESEN ÇOLAK

Bu çalışmada, zencefil (*Zingiber officinale*) ilaveli yemlerin *Aeromonas hydrophila* enjeksiyonu sonrası Nil Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'larındaki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Deneme balıkları farklı oranlarda (%0; %0,1; %0,5; %1) zencefil içeren yemlerle 90 gün boyunca beslenmiş ve *A. hydrophila* $1,89 \times 10^9$ cfu/ml enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu takip eden 5. günün sonunda yapılan analizlerde, Zencefil kullanımının, eritrosit ($2,13 \times 10^6/\text{mm}^3$) ve lökosit miktarında ($22,27 \times 10^3/\text{mm}^3$), hematokrit yüzdesinde (%40,41) ve lökosit hücre formüllerinden monosit ve ösinofil yüzdelerinde önemli ($p < 0,05$) yükselmeler kaydedilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Zingiber officinale*, İmmünostimülant, *Aeromonas hydrophila*, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF IMMUNOSTIMULANT EFFECT OF DIETS ADDITIVE GINGER (*Zingiber officinale* Roscoe) ON NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758).

Sevkan ÖZÜTOK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FISHERIES

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Aysel ŞAHAN
Year: 2011, Pages: 51
Jury : Asst. Prof. Dr. Aysel ŞAHAN
:Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
:Asst. Prof. Dr. Sibel ÖZESEN ÇOLAK

Determination of the immunostimulant effect of ginger (*Zingiber officinale*) additive fish diets after *Aeromonas hydrophila* injection on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) was the aim of this study. Fish in the experiment group, were fed with ginger added feeds at different rates (0%, 0.1%, 0.5%, 1%) for 90 days before *A. hydrophila* 1.89×10^9 cfu/ml injection. Blood analysis were conducted 5 days later following the injection. In comparison to the control group, fish treated with ginger revealed higher concentrations in the following blood parameters: erythrocyte ($2.13 \times 10^6/\text{mm}^3$) and leukocyte ($22.27 \times 10^3/\text{mm}^3$) count the percentage of hematocrit (40.41%) and also significant increase ($p < 0.05$) in the percentage monocyte and eosinophil was recorded according to the leukocyte cell formulations.

Key Words: *Zingiber officinale*, Immunostimulant, *Aeromonas hydrophila*, *Oreochromis niloticus*

TEŞEKKÜR

Tezime başladığım andan itibaren desteğini, ilgisini ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Aysel ŞAHAN'a ve Prof.Dr. İbrahim CENGİZLER ile Yrd.Doç.Dr. Sibel ÖZESEN ÇOLAK'a, yemlerin hazırlanması ve yetiştiricilik konusunda destek olan hocalarım Prof.Dr. Suat DİKEL'e, Doç.Dr. Tufan EROLDOĞAN'a, Yrd.Doç.Dr. Oğuz TAŞBOZAN'a, laboratuvar çalışmalarım da destek olan hocam Yrd.Doç.Dr. Fatmagün SARIHAN'a, deneme kurulumu ve bitiminde destek olan Öğ.Gör.Dr. Argun A. ÖZAK'a, Uzm. İbrahim DEMİRKALE'ye, Arş. Gör. Asuman YILMAZ'a, Arş. Gör. Erhan ERDOĞAN'a, Arş. Gör. Serhat TÜRKMEN'e, deneme boyunca yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Başak ÇETİNKOL'a, Çiğdem DİKEL'e, ve Gülay GÖK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Büyük fedakarlıkla her zaman sabır, sevgi ve destekleriyle yanımda olan değerli babam Mehmet MUĞLU'ya, annem Ayşe Lale MUĞLU'ya, ayrıca sevgi, ilgi, destek ve yardımlarıyla hep yanımda olan eşim Onur ÖZÜTOK'a gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	.VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Balık materyali	13
3.1.2. Yem materyali.....	14
3.1.3. Enfeksiyon materyali	15
3.2. Metot	16
3.2.1. Denemenin Kurgusu.....	16
3.2.2.Yem Katkı Maddesinin Hazırlanması	17
3.2.3. Deneysel Enfeksiyonun Oluşturulması	18
3.2.4. Balıklardan Kan Örneklerinin Alınması	18
3.2.5. Eritrosit ve Lökosit Miktarının Belirlenmesi	19
3.2.6. Hemogloblin (Hb) Tayini.....	20
3.2.7. Hematokrit (Hct) Tayini.....	20
3.2.8. Lökosit Hücre Formülleri Tayin	21
3.3. İstatistiksel Analizler.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Bulgular	23
4.1.1. Enfekte Balıkların Klinik ve Nekropsi Bulguları	23
4.1.2. Hematolojik Bulgular.....	26
4.1.2.1. Eritrosit Değerleri.....	26

4.1.2.2. Hemoglobin Değerleri.....	27
4.1.2.3. Hematokrit Değerler.....	28
4.1.2.4. Lökosit Değerleri.....	28
4.1.2.5. Lökosit Hücre Formülleri.....	29
4.1.2.6. Kan Yaymaları.....	31
4.2. Tartışma.....	34
4.2.1. Enfekte Balıklarda Nekropsi	34
4.2.2. Eritrosit Değerleri.....	34
4.2.3. Hemoglobin Değerleri.....	37
4.2.4. Hematokrit Değerleri	37
4.2.5. Lökosit Değerleri.....	38
4.2.6. Lökosit Hücre Formülleri.....	40
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)’in Kimyasal Bileşenleri.....	15
Çizelge 3.2. Denemede Kullanılan Yemlerin Kuru Madde ve Ham Kül Değerleri (%).....	18
Çizelge 4.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> ’nın Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	24
Çizelge 4.2. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> ’larda RBC, Hb, Hct Ortalamaları.....	26
Çizelge 4.3. Çizelge 4.2. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> ’larda WBC Değerleri.....	29
Çizelge 4.4. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> ’larda Lökosit Hücre Formülleri(%).....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Zencefilin Kimyasal Ana Bileşenler.....	3
Şekil 3.1. Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Birimi, Deneme Grupları.....	13
Şekil 3.2. Araştırmada Kullanılan Nil Tilapia (<i>O. niloticus</i>)'sı.....	14
Şekil 3.3. (A) Zencefil (<i>Z. officinale</i>) Rizomları (B) Zencefil (<i>Z. officinale</i>) Toz Hali.....	14
Şekil 3.4. <i>A. hydrophila</i> 'ya Ait Bakteri Kolonileri.....	16
Şekil 4.1. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> 'ta Yüzgeç Tabanlarında Hiperemik Alanlar.....	24
Şekil 4.2. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> 'ta Yüzgeç Uçlarında Erimeler.....	25
Şekil 4.3. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> 'ta Solungaçların Genel Görünümü	25
Şekil 4.4. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte <i>O. niloticus</i> 'ta İç Organlar.....	25
Şekil 4.5. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'larda Ortalama Eritrosit Değerleri ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	27
Şekil 4.6. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'larda Ortalama Hemoglobin Değerleri (g/dl)	27
Şekil 4.7. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'larda Ortalama Hematokrit Değerleri (%)......	28
Şekil 4.8. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'larda Ortalama Lökosit Değerleri ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	29
Şekil 4.9. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'lardan Elde Edilen Lökosit Hücre Formülleri (%)......	31
Şekil 4.10. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'lardan Elde Edilen Eritrosit (E), Lenfosit (L), Monosit (M) ve Nötrofil (N) Hücreleri ($\times 100$)......	32

Şekil 4.11. <i>A. hydrophila</i> ile Enfekte Edilmiş <i>O. niloticus</i> 'lardan Elde Edilen Eritrosit (E), Lenfosit (L), Monosit (M) ve Nötrofil (N) Hücreleri (x100).....	33
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

spp.	: Türler
mg/lt	: Miligram/Litre
dl/g	:Desilitre/Gram
mm ³	: Milimetre Küp
⁰ C	:Santigrat Derece
LD50	:%50'sini Öldüren Öldürücü Doz
cfu/ml	: Colony Forming Unit/Mililitre
g /kg	:Gram /Kilogram
ml	:Mililitre
µg/ml	:Mikrogram/Mililitre
mg/kg	:Miligram/Kilogram
cm	:Santimetre
A.Ş	:Anonim Şirketi
µm	:Mikrometre
Lab.	:Laboratuvar
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
RBC	:Eritrosit
WBC	:Lökosit
Hb	:Hemoglobin
Hct	:Hematokrit
MCH	:Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin (Mean Corpuscular Hemoglobin)
MCV	:Ortalama Eritrosit Hacmi (Mean Corpuscular Volume)
H ₂ O	:Su
cc	:Mililitre
rpm	:Her Bir Dakikadaki Dönme Süresi (Revolutions Per Minute)
SPSS	:Sosyal Bilimler İçin İstatistiksel Paket Program (Statistical Package For The Social Sciences)
TSA	:Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth
g/dl :Gram/Desilitre

1. GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde performansı artırmak, sağlığı korumak ve hayvansal ürünlerin miktar ve kalitesini olumlu yönde etkilemek için çeşitli yem katkı maddeleri kullanılmaktadır. Avrupa Birliği'nin 2006 yılından itibaren hayvan yemlerine medikament eklenmemesine karar vermesi, hayvan yemi ilaveleri konusunda bilim adamlarını doğal kaynak araştırmaya sevk etmiştir. Bu doğal maddeler (probiyotikler, prebiyotikler, enzimler ve çeşitli aromatik bitkiler) ise bakterileri öldürebilen, hayvanların sindirim sistemlerini geliştirebilen, büyüme potansiyelini arttırabilen özellikte olmalıdır (Şengezer ve Güngör, 2008).

Nil Tilapia (*O. niloticus*)'sı *Cichlidae* familyasına ait bir tatlı su balığı türüdür ve Dünya'da yaygın olarak kültürü yapılan balıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Tilapia, diğer balık türlerinin kullanamadığı çok çeşitli besin maddelerini değerlendirip ete dönüştürmesi, yapay yetiştiricilikte havuzlardaki yoğun stok bakım ve yapay besleme koşullarına kolayca uyum sağlayabilmesi nedeniyle üzerinde çalışılan bir türdür. Ayrıca, kısa bir besin zincirine sahip olması, hastalıklara karşı dayanıklı olması, hızlı üremesi ve kolay döl alınabilmesi, etinin lezzetli olması nedeniyle de diğer iç su ürünlerine göre tercih edilen bir balıktır (Dikel, 2009).

Günümüzde 100 kadar tilapia türünden 10 tanesi yetiştiricilikte başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca ekstansif ve yarı intensif yetiştiricilik koşullarında yetiştiriciliğinin yapılabilmesi, pazar probleminin olmaması, basit bir biçimde üretilmesi, yoğun olarak stoklanabilmesi, hastalıklara direncinin fazla olmasından dolayı tercih edilmektedir (Dikel, 2009).

Ekstansif ve yarı intensif yetiştiricilikte ciddi enfeksiyonlara nadiren rastlanır. Fakat elle muamele, yoğun stoklama ve yemleme, düşük su kalitesi gibi stres faktörünü arttıracak koşullar altında yapılan yetiştiricilik, balık türlerini patojenlere karşı daha hassas kılar. Bu nedenle de sıcaklığın yüksek olduğu veya çevresel koşulları optimize etmenin zor olduğu soğuk bölgelerde bulaşıcı hastalıklar oldukça ciddi problemler oluşturmaktadır (Sarder ve ark., 2000). Bu koşullar altında üretici genelde eskiden beri uyguladığı antibiyotik tedavisi yoluna gitmektedir. Bilinçsiz bir şekilde uygulanan antibiyotikler hem maliyeti arttırmakta hem de katkılı ürünlerin

sofralara ulaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda hastalıklara karşı dirençli bireyler elde etmek, balık bireylerinin bağışıklık sistemlerini aktif hale geçirmek için sentetik ve biyolojik maddelerden oluşan immüностimülanlar kullanılmaya başlanmıştır (Sakai, 1999). İmmüностimülanlar ve immün sistemi düzenleyiciler memelilerde özel olmayan hücresel ve sıvısal savunma mekanizmalarını uyaran sentetik ve biyolojik bileşenlerin bir bölümünü kapsamaktadır. İnsanlarda yoğun bir kullanım alanı olan immüno modülatör ilaçlar/maddeler, veteriner hekimlikte de hayvanların özel olmayan immün sistemlerini uyardığı için önem kazanmıştır. İmmüностimülanlar üzerine yapılan çalışmaların çoğunda, insan ve hayvanlardaki tümörlerin tedavi edilmesi üzerine odaklanılmıştır (Düğenci ve ark., 2003). Tümör tedavisindeki doğal ve sentetik immüностimülanlar; makrofajları, nötrofilleri, doğal öldürücü hücreleri ve T hücre aracılı immüniteyi uyarak harekete geçirir. Kültür balıkçılığında ise; immüностimülanların kullanımı ile balıkların çeşitli viral, paraziter ve bakteriyel hastalıklara karşı direnç kazandıkları, larval dönemde meydana gelen mortalitenin azaldığı, büyümede artış gözleendiği ve stresin olumsuz etkilerinin görülmediği bildirilmiştir (Abdel-Tawwab ve ark., 2010). İmmüностimülanlar sucul hayvanlardaki hastalıkların önlenmesinde aşılama çalışmalarına alternatif ve destekleyici bir olanak sağlamıştır (Gopalakannan ve ark., 2006).

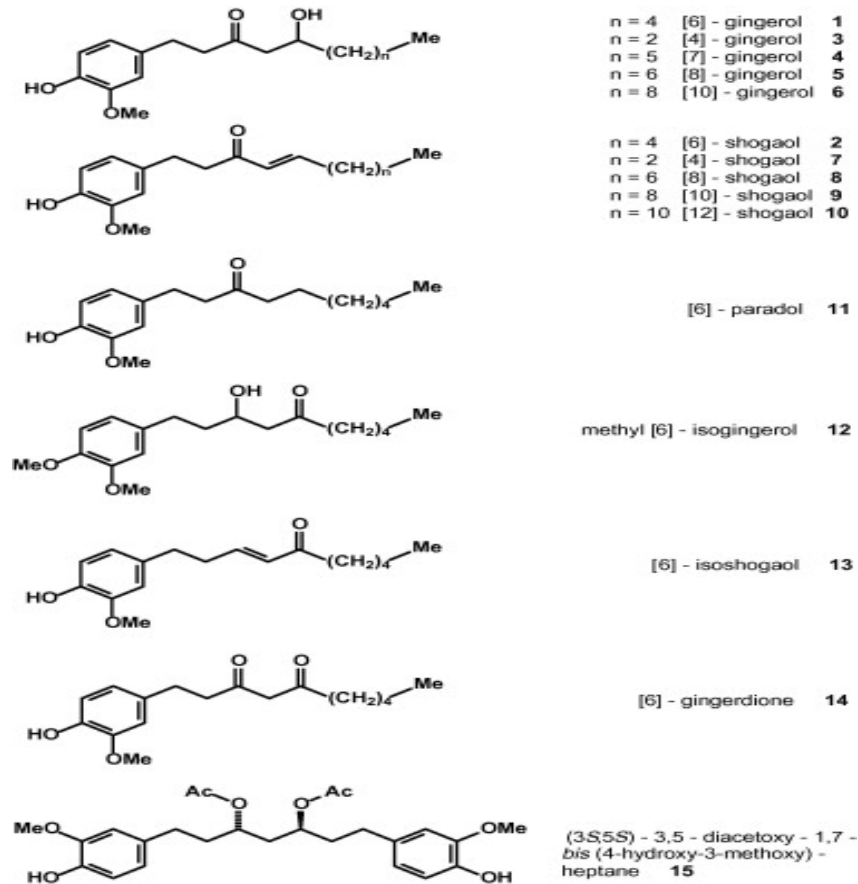
Balıklarda özel olmayan bağışıklık sentetik ve biyolojik immüностimülanlar tarafından uyarılır. Biyolojik immüностimülanlardan; levamisol, β -glukan, peptidoglikan, kitin, kitosan, maya ve vitamin kombinasyonları, bitki ve hayvanlardan elde edilen çeşitli ürünler birçok hastalığın kontrol ve tedavisinde kullanılmaktadır (Raa, 1996; Verlhac ve ark., 1998; Lakshmi ve Sudakar, 2010; Şahan ve Duman, 2010).

Önemli olan nokta, etkin yanıt alabilmek için kullanılan immüностimülanların hangi zamanda, hangi koşullarda, ne kadar dozda ve sürede verilmesi gerektiğidir. İmmüностimülan enjeksiyonunun, banyo ya da oral uygulanabilir olması, kolay kullanılabilir olduğunun göstergesidir (Sakai,1999). Yapılan çalışmalarda oral yoldan verilen immüностimülanların, enfeksiyonlara karşı koruduğu balığın direncini arttırdığı bildirilmiştir (Ardo ve ark., 2010).

Roma, Çin, Yunan ve Osmanlı tıp tarihi kayıtları, Geleneksel tedavi edicilerden biri olan zencefil (*Zingiber officinale*)'in tıbbi bir bitki olarak kullanıldığını göstermektedir. Zencefil fenol bileşenleri, nişasta, B3 vitamini, B6 vitamini, demir, fosfor, kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum mineralleri bulundurur (Konuklugil ve Özçelikay, 2001). Şekil.1.1.'de zencefilin kimyasal ana bileşenleri verilmiştir (Ali ve ark., 2008).

Zencefil;

- İştah açıcıdır,
- Antiseptik özelliğindedir,
- Sindirimi kolaylaştırır,
- İyi bir anti-oksidandır (Konuklugil ve Özçelikay, 2001).



Şekil 1.1. Zencefilin Kimyasal Ana Bileşenleri (Ali ve ark., 2008)

Yararlı bitkiler içerisinde bilinen Zencefil rizomları (yumruları) geniş spektrumlu profilaktik ve terapatik fonksiyonlarıyla tanınır (Düğenci ve ark.,2003). Böylece balıklarda olduğu gibi diğer hayvanlarda da bağışıklık düzenleyici bir ajan olarak etkin rol alır (Stoilova ve ark, 2007). Nya ve Austin (2009), Zencefili anti-inflamatuar ve anti-oksidatif aktivitesi nedeniyle paraziter, fungal ve bakterilerin kontrolünde kullanmışlardır. Çalışmalarında *Aeromonas hydrophila*'yla enfekte olmuş gökkuşağı alabalığının sarımsak (*Allium sativum*) ve zencefil (*Z. officinale*) ile kontrol edildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada zencefilin balıklarda ve insanlarda karaciğer dokusunda anti-oksidan etki yarattığı; gastrointestinal sıvıdaki enzimatik mekanizmaları uyararak, sindirim enzimlerinin daha iyi çalışmasına katkı sağladığı belirtilmiştir (Stoilova ve ark., 2007).

Deneyisel enfeksiyon oluşturmak için kullanılan *Aeromonas hydrophila*; *Vibrionaceae* familyasına ait olup, özellikle sıcak sularda bulunan bir bakteridir. Tatlı ve tuzlu su kaynaklarında, kanalizasyon sularında ve çevrede yaygın olarak bulunan bazı sucul canlılarda özellikle de balıklarda hastalık oluşturan fırsatçı bir bakteridir. Ayrıca *Aeromonas* spp. balık, deniz kabukluları, kurbağa ve insan dahil olmak üzere geniş bir konak dağılımına sahiptir. Hareketli *Aeromonas* türleri, balık yetiştiriciliği yapılan ortamlarda yüksek oranda ölüme yol açar. Hastalığın ortaya çıkış ve yayılışında stres önemli bir faktördür. *Aeromonas*'ın neden olduğu *Aeromonas* Septisemisi hastalığı; birçok tatlı su, tuzlu su, soğuk ve ılık su türlerini etkilemektedir (Harikrishnan ve Balasundaram, 2005).

Bir sıcak iklim balığı olan Nil Tilapia'sı, çok yaygın olmamakla birlikte Çukurova bölgesinde de bulunan bir türdür. Halen Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Tatlısu Balıkları Araştırma İstasyonunda da yetiştiriciliği devam etmektedir.

Yapılan bu çalışma ile *A. hydrophila* ile enfekte edilen Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larının zencefil (*Z. officinale*) ile beslenmeleri sonucu endojen savunmalarında artış olup olmadığı ve zencefilin bu yöndeki kullanılabilirliği belirlenmiştir. Çalışmada, Tilapia yetiştiriciliğinde hastalık nedeniyle oluşacak kayıpların azaltılması ve bir daha oluşmaması, bilinçsiz ilaç tüketiminin önüne geçilmesi ve profilakside doğal ürünlere yer verilmesinde elde edilecek sonuçlardan yararlanılması hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zencefil ekstraktının balık yemlerine eklenmesi ve bunun balık immün sistem üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmasına karşın, konuyla ilgili Nil Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'ları üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bölümde zencefil, yem katkı maddeleri, bitkisel immünostimülantlar ve bakteriyel enfeksiyonların farklı balık türlerine etkileri ile bu konuda yapılan araştırmaların sonuçlarına yer verilmiştir.

Peters ve ark. (1988), juvenil Gökkuşluğu Alabalık (*Salmo gairdneri*)'larına banyo tarzında ve intraperitoneal enjeksiyonla uyguladıkları *A. hydrophila*'nın kan glikoz seviyesi, lökosit miktarı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında intraperitoneal (IP) enjeksiyonunun kan glikoz seviyesini, lökosit miktarını önemli derecede arttırdığını bildirmişlerdir.

Azizoğlu ve Cengizler (1996), sağlıklı Nil Tilapia (*O. niloticus*) bireylerinde bazı hematolojik parametreleri saptamaya çalışmışlardır. Araştırmada, eritrosit miktarını $2,16-4,005 \times 10^6/\text{mm}^3$, lökosit miktarını $25,6-77,5 \times 10^3/\text{mm}^3$, hematokrit değerini %25-%44, hemoglobin miktarının ise 3,6 dl/g, su sıcaklığının 17-23,5 °C, O₂ miktarının 6,3-8,5 mg/l olduğunu bildirmişlerdir.

Khalil ve Mansour (1997), *A. hydrophila*'dan salgılanan hemolitik ve proteolitik ekstra-selüler ürünlerin inkübasyon süresi ve sıcaklığının lethal toksisiteye etkisini çalışmışlardır. *A. hydrophila*'nın 35 °C de 30 saat inkübe edildiğinde, hemolysin ürünlerinin en fazla üretildiğini tespit etmişlerdir. Tilapia eritrosit hücrelerinin hemolitik aktivitesinin, koyun eritrositinden daha başarılı olduğunu bulmuşlardır. Ekstra-selüler ürünler 55 °C'de 15 dakika ya da 60 °C'de 10 dakika ısıtıldığında, hemolitik aktivitenin Tilapia eritrositlerini tamamen inaktive ettiğini tespit etmişlerdir. Bakteriler 30 °C'de 36 saat tutulduğunda proteolitik aktivitenin maksimuma ulaştığını bulmuşlardır. Ekstra-selüler ürünler 80 °C'de 10 dakika ya da 70 °C'de 15 dakika kaldıktan sonra Proteaz enziminin tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. *A. hydrophila*'nın hemolitik üretim, proteolitik lethal eksotoksik (LD50 $2,1 \times 10^4$ hücre/balık) etkilerine ek olarak ısı işlem uygulamasının, Tilapia da % 20 ölüme yol açtığını bulmuşlardır. Ekstra-selüler

ürünlerin ise, 100 °C'de 10 dakika sonra tamamen inaktive olduğunu rapor etmişlerdir.

Wang ve Wang (1997), çalışmalarında in vivo bakteriyel enfeksiyonlara karşı 11 Bar (Barley tarafından ekstrakte edilen) içeren polisakkaritlerin, Deks (dekstran sulfat)'ın, inulinin, krestinin, laminaranın, levanın, PO (Pleurotus ostreatus tarafından ekstrakte edilmiş glikan)'nın, sikleroglikanın, YG (maya glukana)'nın ve zimosan'ın Tilapia (*Tilapia aureus*) ve Ot Sazanı (*Ctenopharyngodon idellus*)'na etkilerini araştırmışlardır. Dört glikan (Bar, krestin, skleroglikan ve zimosan)'nın *A. hydrophila* enjeksiyonu sonrası Tilapia (% 80, 60, 70 ve 60) ve Ot Sazanı (%60, 70, 90 ve 60)'nın hayatta kalma oranlarını arttırdığını gözlemişlerdir. *Edwardsiella tarda* enfeksiyonu sonrası dört glikanın tilapia (%70, 60, 80 ve 50)'nın ve ot sazanı (% 50, 50, 70 ve 50)'nın hayatta kalma oranını azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca Bar, krestin, skleroglikan ve zimosanın nitroblue tetrazolium (NBT) pozitif hücre artışının anlamlı olduğunu bulmuşlardır.

Sakai (1999), glukana, kitin, lactoferrin ve levamisolün balıklar ve karidesler için immüno stimulant etkisinin olduğunu bildirmiştir. C ve B vitamini, prolaktin hormonu gibi besinsel faktörlerin immüno stimulant olabileceğini bildirmiştir. İmmün sistemi uyarıcıların fagositik hücrelerin işleyişini ve bakterisidal aktiviteyi kolaylaştırıcı etkide olduğunu, balığın doğal öldürücü hücrelerini, komplement, lizozim ve antikor yanıtlarını tetikleyici rol oynadığını bildirmiştir. immüno stimulant ilave edilmesiyle *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* ve *Streptococcus spp.* gibi bakteriyel ve beyaz benek hastalığı gibi paraziter hastalıklara karşı korunmanın arttığı, fakat *Renibacterium salmoninarum*, *Pasteurella piscicida* gibi intraselüler patojenlere karşı korunmanın gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Balığa immüno stimulant ilave etmenin en etkili yönteminin enjeksiyon ile olduğunu rapor etmişlerdir. Ağız ya da immersiyon yöntemi de rapor edilmesine rağmen, uzun süreli uygulamada bu yöntemlerin etkinliğini kaybettiğini bildirmişlerdir. Bazı immüno stimulantların aşırı dozlarının balıklarda bağışıklığı baskılayıcı etki yaptığını ve immüno stimulantların yan etkilerinin iyi anlaşılamadığını bildirmiştir. Bazı immüno stimulantların seksüel hormonlarla bağışıklığı tetikleyici rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Düğenci ve ark. (2003), çalışmalarında yem içeriğinde ki çeşitli şifalı bitki ekstraktlarının, Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'larında immünostimulant etkisini araştırmışlardır. Uygulama balıklarına eşit miktarda ökse otu %0,1 ve 1 (*Viscum album*), ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) eklemiştir. 3 hafta boyunca % 1'lik zencefile beslenen gökkuşığı alabalıklarının doğal bağışıklık yanıtlarını önemli bulmuşlardır. Ayrıca %0,1 zencefil içeren grupta kan lökositlerinin fagositoz ve ekstra selüler solunum patlaması aktivitesini, kontrol gruplarına göre oldukça yüksek bulmuşlardır. % 0,1 zencefil içeren grup hariç tüm bitkisel katkılı balık yemlerinde, plazma toplam protein seviyesinin arttığını bildirmişlerdir.

Dominguez ve ark. (2005), çalışmalarında çeşitli çevresel faktörlerin (su sıcaklığı, tuzluluk, pH ve askıda sediment) Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında plazma lizozim aktivitesine etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Balıklar farklı su sıcaklıklarında (18,4; 23; 28 ve 33 °C) beslendiğinde 2-4 hafta sonra plazma lizozim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. 33 °C'de 4 hafta beslenen balıklarda ise lizozim aktivitesinin düştüğünü bulmuşlardır. Bu sonuç araştırmacılara su sıcaklığının plazma lizozim aktivitesine etki ettiğini göstermiştir. 24 g/l tuzlulukta 2-4 hafta ve 12 g/l tuzlulukta 4 hafta tutulan gruplarda plazma lizozim aktivitesinin oldukça arttığını tespit etmişlerdir. Asidik pH (pH 4,0) ve 2000 mg/l askıda sediment suyunda 2 hafta kalan balıkların lizozim aktivitelerinin oldukça arttığını bildirmişlerdir.

Harikrishnan ve ark. (2005), *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı Sazan (*Cyprinus carpio*)'larda tedavi amaçlı uyguladıkları *Azadiracta indica* bitkisinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, lökosit hücrelerinin kontrol grubuna göre önemli oranda arttığını, hemoglobin, hematokrit ve eritrosit miktarının ise azaldığını tespit etmişlerdir.

Sarihan ve Cengizler (2005), çalışmalarında levamisolün Tilapia (*O. niloticus*)'da özel olmayan savunma mekanizmaları ile *Streptococcus iniae* enfeksiyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. İlk denemesinde *S. iniae* (1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 ve 1×10^5 cfu/ml)'nin, IP olarak enjekte edildikten sonra %50 sini öldüren dozu (LD50) belirlemişlerdir. İkinci denemede ise 24 saat banyo yoluyla 5;

7,5 ve 12,5µg/ml levamisol uygulamışlardır. Denemenin 7, 14, 21 ve 28. günlerinde alınan kan örneklerinde hematokrit, lökosit, lökokrit, nitroblue tetrazolium (NBT) pozitif hücre aktivasyonu, NBT aktivitesi (spektrofotometrik olarak belirlenen), periferik yayma miyeloperoksidaz aktivitesi, fagositik aktiviteyi tespit etmişlerdir. Üçüncü denemede, 24 saatlik banyo yoluyla 5; 7,5 ve 12,5µg/ml levamisol uyguladıktan sonra 14. gün balıklara *S. iniae* (1×10^4 cfu/ml) intraperitoneal olarak enjekte edilerek, nispi yaşama yüzdesini sırayla % 25, 51 ve 51 olarak hesaplamışlardır.

Gopalakannan ve Arul (2006), çalışmalarında Sazan (*C. carpio*)'ların kitin, kitosan ve levamisol eklenmiş yemlerle 90 günlük besleme sonrasında *A. hydrophila* enfekte etmişlerdir. Katkı maddelerinin immun yanıt ve büyümeye etkisi, lizozim, beyaz kan hücresi (WBC) ve NBT aktivitesini çalışmışlardır. Kitin, kitosan ve levamisol içeren yemlerle beslenen balıkların büyüme performanslarının normal yemlerle beslenenlere göre daha anlamlı olduğunu kayıt etmişlerdir. En fazla büyümeyi kitosanlı grup (94,92 g), levamisol (93,25 g) ve kitin (63,54 g)'li gruplar göstermiştir. Kitin, kitosan ve levamisol içeren yemlerin lizozim aktivitesini ve NBT redüksiyonunu uyardığını tespit etmişlerdir. Uygulama balıkları 45 gün sonra *A. hydrophila* ile enfekte edildiğinde hayatta kalma yüzdelерinin kitosanlı (%80), levamisol (%66,7) ve kitin (%40) içeren gruplardan daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. *A. hydrophila* enfeksiyonu sonrasında 90 gün içinde hayatta kalma yüzdeleri %68,9, %57,8 ve %37,5'a düştüğünü ve kitosan içeren yemlerin sazanının hayatta kalabilirliğini ve doğal bağışıklık sistemini uyardığını rapor etmişlerdir.

Sahu ve ark. (2007), fırsatçı *A. hydrophila* hastalık etmeninden korunma ve *Labeo rohita* fingerlinglerinin immün yanıtları konusunda sarımsağın yem içerisindeki dozunu belirlemeye çalışmışlardır. *L. rohita* fingerling (10±2 g) yemlerine Sarımsağı (*Allium sativum*) (%0; %0,1; %0,5 ve %1) oranlarında eklemişlerdir. 20 günde bir farklı biyokimyasal parametreler (serum total protein, albumin, globulin, albumin/globulin oranı, kan glikozu), hematolojik(WBC, RBC ve Hb içeriği) ve immünolojik parametreler (süperoksit anyon üretimi, lizozim aktivitesi, serum bakterisidal aktivite) üzerinde çalışmışlardır. 60 günün sonunda balıklar *A. hydrophila* ile enfekte edilmiş ve enfeksiyonu takip eden 10 gün boyunca

ölüm oranını (%) kayıt etmişlerdir. Enfeksiyondan 10 gün sonra kontrol (%0) grubunda hayatta kalma oranının (%57) düştüğünü tespit etmişlerdir. Sarımsak uygulanmış grupların 1g sarımsak kg⁻¹ (B grubu) (%85); 5 g sarımsak kg⁻¹ (C grubu) (%71); 10g sarımsak kg⁻¹ (D grubu) (%71) hayatta kalma oranını açıkça artırdığını görmüşlerdir. Sarımsağın (*A. sativum*) bağışıklığı uyarıcı etkisinin olduğu ve *L. rohita*'ları *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı koruduğunu tespit etmişlerdir.

Abdel-Tawwab ve ark. (2008), çalışmalarında Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında büyümeyi ve bağışıklığı teşvik edici olarak ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) kullanımının geliştirilmesini amaçlamışlardır. Balıklar (0,33g) 140 litrelik akvaryumlara 25'er adet yerleştirilmiştir. Yemlere 0,0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 ve 5,0g maya eklemişler ve balıkları 12 hafta boyunca beslemişlerdir. 12 haftalık deneysel periyodun bitiminde *A. hydrophila*'yı intraperitoneal olarak enjekte etmişlerdir. 10 gün boyunca balıkların klinik bulguları ve günlük ölüm oranlarını kayıt etmişlerdir. Ekmek mayasının büyümeyi teşvik edici etkisini belirlemişlerdir. 1,0 -5,0 g maya/kg içeren yemlerle beslenen balıklarda büyüme, yem alımı ve protein çevriminin optimum olduğunu bulmuşlardır. Yani maya ilavesinin balıklarda protein birikimini arttırdığı sonucuna varmışlardır. 1,0; 2,0; 5,0 g maya içeren yemlerle beslenen balıkların biyokimyasal parametrelerinde iyileşme gözlemişlerdir. *A. hydrophila* enjeksiyonundan 10 gün sonra balık ölümünde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Maya miktarının artışına bağlı olarak balık serumunda azalma, ayrıca en düşük balık ölümü ve bakteriyel birikimin 5,0 g maya/kg yemle beslenmiş grupta olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların sonuçlarına göre, ekmek mayası ilavesinin, Tilapia yetiştiriciliğinde hastalıklardan korunmak için alternatif bir antibiyotik olarak kullanılabileceğini ve optimum ekmek mayası seviyesinin her 1 kilogramlık yeme yaklaşık 1,0 g maya olarak önermişlerdir.

Ardo ve ark. (2008), çalışmalarında bor ve çin medikal bitkiler (*Astragalus membranaceus* ve *Lonicera japonica*)'inin Tilapia'nın özel olmayan bağışıklık sistemi üzerine etkilerini çalışmışlardır. Yemlere, %0,1 *Astragalus* (%0,05 borlu ve borsuz), %0,1 *Lonicera* (%0,05 borlu ve borsuz) ve %0,05 borlu 2 bitki (*Astragalus-Lonicera*) olmak üzere 5 bitkisel varyasyon eklemişlerdir. Kan lökositlerinin solunum patlaması ve fagositik aktivitesini, plazma lizozim, total protein ve toplam

immünoglobulin miktarını haftalık ölçmüşlerdir. 4 haftalık beslenme periyodundan sonra balıkları *A. hydrophila* ile enfekte ederek mortaliteyi kayıt etmişlerdir. Bu çalışmanın sonunda tilapianın bitkilerle tek tek veya kombine halde beslenmesiyle kan fagositik hücrelerinin solunum patlaması ve fagositik aktivite değerlerinin anlamlı olduğunu bildirmişlerdir.

Abd-El-Rhman (2009), çalışmasında Propolisin Tilapia (*O. niloticus*)'lara etkisini araştırmıştır. Çalışmayı; Ethanol (kontrol), %1 Propolis-ethanolik-ekstrakt, %1 ethanollü ham propolis (%30 protein) içeren bazal yemlerle beslenenler olmak üzere 3 gruba ayırmıştır. 28 gün boyunca beslenen *O. niloticus*'un *A. hydrophila*'ya karşı dayanıklılığı, propolisin bağışıklığı uyarıcı etkisini, büyüme performansına etkisini saptamıştır. *A. hydrophila*'yı balıklara ($0,2 \times 10^7$ hücre/ml) intraperitoneal olarak enjekte etmiştir. En iyi büyüme oranını değerlerini propolis-ethanolik ekstrakt içeren yemlerle elde etmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise spesifik büyüme ve yem etkinlik oranının en yüksek %1 Propolis-ethanolik-ekstraktlı yemde olduğunu bulmuştur. Hct seviyesinin ve monosit miktarının %1 Propolis-ethanolik-ekstraktlı içeren yemlerde yüksek olduğunu tespit etmiştir. Üç uygulama grubunda da lenfosit miktarında değişim gözlememiştir. Nötrofil miktarının %1 Propolis-ethanolik-ekstraktlı yemde önemli ölçüde düştüğünü ve kontrol grubunda arttığını bildirmiştir. %1 Propolis-ethanolik-ekstraktlı balıklarda serum lizozim, serum bakterisidal aktivitelerinde artış gözlemiştir. Propolis-ethanolik-ekstraktlı yemle beslenen *O. niloticus*'un, ham propolisle beslenenlere göre büyüme, bağışıklık ve direnç mekanizmasının da daha fazla artış olduğunu görmüşlerdir.

Maqsood ve ark. (2009), *A. hydrophila*'ya karşı fingerling Sazan (*Cyprinus carpio*)'lara uygulanan levamisol (125, 250 ve 500 mg/kg)'ün kan parametreleri ve büyüme parametreleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değeri, serum protein, albumin ve globulin miktarındaki önemli ($p < 0,05$) yükselişin özellikle 250mg/kg levamisol uygulanan grupta olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde spesifik büyüme oranı ve yem değerlendirme oranının en iyi 250 mg/kg levamisol uygulanan grupta olduğunu, bunu 500 mg/kg ve 125 mg/kg levamisol uygulanan grupların izlediğini bildirmişlerdir.

Nya ve Austin (2009), Gökkuşığı Alabalığı (*O. mykiss*) yemlerine %0; 0,05; 0,1; 0,5 ve 1,0 Zencefil (*Z. officinale*) eklemişlerdir. 14. günün sonunda balıkları *A. hydrophila* ile enfekte etmişlerdir. % 0,5 zencefil eklenmiş grubun % 0 (kontrol)'a göre ölüm oranının düştüğü, protein etkinliği yem çevriminin ve büyümede artışı tespit etmişlerdir. %0,1; 0,5; 1 zencefil içeren gruplarda lenfosit, makrofaj ve nötrofil sayısındaki proliferasyon ve buna bağlı olarak fagositoz, lizozim, solunum patlaması, bakterisidal ve anti-proteaz aktivitesinin anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Abdel-Tawwab ve ark. (2010), çalışmalarında yeşil çay (GT) (*Camelia sinensis* L.)'ın Tilapia yemlerinde kullanımının geliştirilmesi ve balık sağlığına etkisini çalışmışlardır. GT (Green tea)'yi yemlere 0,0 (kontrol), 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 ve 2,0 g/kg olarak eklemişlerdir. Balıklar (1,5-2,0 g) 12 hafta boyunca 100 lt'lik her bir akvaryuma, 20 balık olacak şekilde yerleştirmişlerdir. Yemleme sonrasında her bir gruba *A. hydrophila* patojeni uygulamışlardır ve normal olmayan klinik bulgular, günlük ölümler kaydedilmiştir. Optimum büyümeyi 0,5g GT yemlerinde bulmuşlardır. 0,5 GT eklenmiş grubun protein içeriğinin yükseldiğini, 0,0-0,5 GT içerikli gruplarda lipid içeriğinin en düşük miktarda olduğunu gözlemişlerdir. 0,25-2,0g GT içeren yemlerde Hematolojik ve biyokimyasal parametre değerlerinin artış gösterdiğini, kontrol grubunda ise en düşük değerde olduğunu tespit etmişlerdir. Balık yemlerindeki GT içeriğinin artmasıyla *A. hydrophila* uygulanmış balıkların hayatta kalma oranının artırdığı bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre, GT'nin bağışıklığı uyarıcı olduğunu, optimum 0,5 g/kg GT miktarının Tilapia da Aeromoniosis engellediği, balığın performans ve sağlığını arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Aldık ve Cengizler (2010), yemlere eklenen zeolit in *A. hydrophila* enjeksiyonuna karşı Tilapia bireylerinin doku ve organlarındaki koruyucu etkisini araştırmışlardır. Denemede $1,9 \times 10^6$ cfu/ml bakteri vermişler ve enfeksiyonun ardından, balıklar 21 gün süreyle gözlenmişlerdir. 7., 14. ve 21. günlerde balıklardan solungaç, böbrek ve karaciğer doku örnekleri alınmış ve bunlarda bakteriden kaynaklanan iç organ hasarlarını değerlendirmişlerdir. Zeolit katkılı beslemede bazı hasarların daha az olduğu gözlenirken, bazılarında oldukça yüksek doku hasarlarının olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan makroskopik gözlemlerde zeolit takviyesi alan

balık gruplarında dış görünümde bozulma olmadığını bildirmişlerdir. Makroskobik incelemede zeolitin, bakterilerin oluşturduğu patolojileri geciktirdiği, ancak mikroskobik incelemede doku hasarlarına karşı etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Ardo ve ark. (2010), *A. hydrophila* enfeksiyonuna uğramış genetik olarak farklı 20 Cyprinidae türünde doğal ve özel antikorların seviyesini ve özel olmayan immün yanıt parametre değerlerini tespit etmişlerdir. Bu familyadan 10 hassas ve 10 dirençli türü seçmişlerdir. Kan örneklerini ise enjeksiyonu takiben 12. saat, 7. gün ve 21. günlerde almışlardır. Kan plazmasının lizozim aktivite, fagositik hücrelerin solunum patlaması ve fagositoz aktivite değerlerini araştırmışlardır. *A. hydrophila*'ya karşı özel ve doğal antikorların seviyesinin 21. günde artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Enfekte olmuş hassas ve dirençli familyaları kontrol olarak kullanmışlardır. Enfekte dirençli türler ve hassas türler arasında lizozim ve fagositik aktivite değerlerinin anlamlı olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar *A. hydrophila* enfeksiyonu sonrası dirençli türlerin özel antikorlarının, plazma lizozim aktivitelerinin ve lökosit fagositik aktivitelerinin daha yüksek değerde olduğunu bulmuşlardır.

Şahan ve Duman (2010), araştırmalarında β -glukan uygulamasının Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larının özel olmayan immün yanıt ve hematolojik parametreler üzerine etkisini araştırmışlardır. Balıklar iki hafta boyunca %0,5 ve %0,1 oranlarında β -glukan içeren ve β -glukan içermeyen (kontrol) yemlerle beslenmişlerdir. İki farklı dozla iki haftalık besleme sonrasında, eritrosit (RBC), lökosit (WBC), hematokrit (Hct), hemogloblin (Hb) miktarı, lökosit hücre tipleri (lenfosit, monosit, nötrofil, eosinofil yüzdeleri) fagositik aktivite miktarı, eritrosit hücre indeksleri (MCV, MCH) ve kan hücre büyüklüklerini tespit etmişlerdir. Denemenin sonunda, %0,1 oranında β -glukan ile beslenen balıklarda WBC ve fagositik aktivite miktarının, lenfosit ve monosit yüzdelerinin %0,5 β -glukan ve kontrol gruplarından daha yüksek olduğunu bulmuşlardır ($p<0,05$). Gruplar arasında Hb, Hct, MCV, MCH, nötrofil, eosinofil yüzdeleri ve hücre büyüklüklerinde herhangi bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir ($p>0,05$). Ayrıca deneme gruplarında RBC miktarını daha yüksek bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma balıkları, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlı Su Balıkları Araştırma İstasyonundan temin edilip, çalışma Ekim 2010 ile Haziran 2011 tarihleri arasında Fakülte Yetiştiricilik Biriminde yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Birimi, Deneme Grupları (orjinal)

3.1. Materyal

3.1.1. Balık Materyali

Türkiye sularında doğal olarak bulunmayan Tilapia (*Tilapia zilli* ve *Oreochromis niloticus*), ilk kez 1975 yılında D.S.İ Adana 6. Bölge Müdürlüğü tarafından Suriye'den getirilmiştir. Bu türler üzerine Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi tarafından adaptasyon çalışmaları yapılmış ve büyük ölçüde başarı sağlanmıştır (Dikel, 2009).

Denemede ortalama ağırlıkları $25,58 \pm 0,025$ g, ve boyları $12,4 \pm 0,09$ cm olan 180 adet sağlıklı Nil Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'sı (Şekil 3.2) kullanılmıştır.

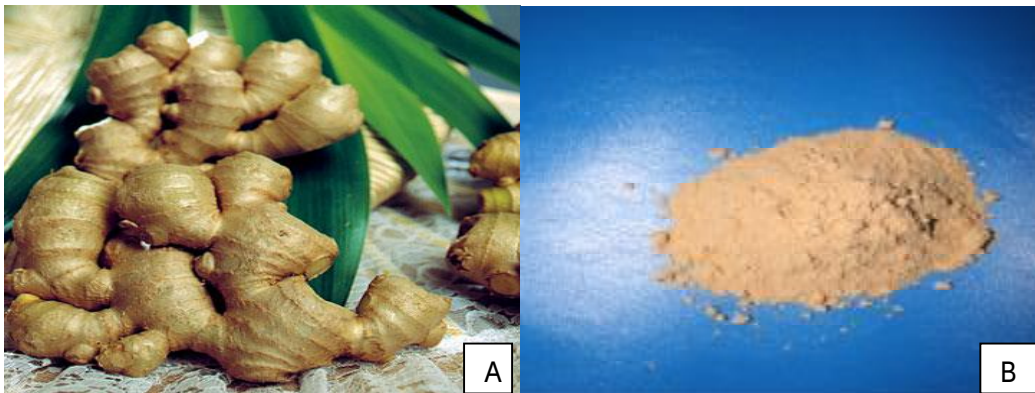


Şekil 3.2. Araştırmada Kullanılan Nil Tilapia (*O. niloticus*)'sı (orjinal)

3.1.2. Yem Materyali

Araştırmada kullanılan balık yemi Pınar Yem A.Ş fabrikasından satın alınmıştır.

Araştırma materyali zencefil (*Zingiber officinale*) *Zingiberaceae* familyasından olup, tropikal iklim karakterindeki coğrafik alanlarda yaşayan ve yetişen yumru köklü sarımtırak bir bitkidir. Rizomlar halinde yetişir ve rizomlar toprağın altında yer alır (Ali ve ark.,2008). Şekil 3.3. (A)'da zencefil rizomları, Şekil 3.3. (B)'de toz haldeki zencefil (*Z. officinale*) ticari olarak piyasadan temin edilmiştir. Zencefil (*Z. officinale*)'in GC-MS analizi sonucunda elde edilen kimyasal bileşenleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. (A) Zencefil (*Z. officinale*) Rizomları (Güveloğlu, 2007)

(B) Zencefil (*Z. officinale*) Toz Hali (orjinal)

Çizelge 3.1. Zencefil (*Zingiber officinale*)’in Kimyasal Bileşenleri

%	Kimyasal Bileşenler
1,47	EICOSANE, 3-METHYL
12,16	HOMOVANILLYL ALCOHOL
20,87	GINGEROL
6,54	LEDOL
4,03	ALPHA.-EUDESMOL
1,52	P-HYDROXYNOREPHEDRINE
1,48	2-AMINO-3-METHYLBUTANE
1,77	CIS-8-SHOGAOL
2,87	DOTRIACONTANE
7,66	CIS-6-SHOGAOL
4,47	DODECYL ETHER
6,31	HEPTACOSANE
10,09	HEXADECANE
18,76	NONACOSANE

3.1.3. Enfeksiyon Materyali

Vibrionaceae familyasına ait *A. hydrophila*, 0,8-1×1,0-3,5µm boyutlarında, basil, gram negatif, hareketli, fakültatif anaerobik, kahverengimsi sarı beyaz renkte, yarı şeffaf, düzgün yüzeyli, yuvarlak koloni morfolojisine sahiptir (Şekil 3.4.). Sucul ortamda ve canlılarda sıklıkla görülen bir bakteri olup, balık yetiştiriciliği yapılan ortamlarda yüksek oranda ölüme yol açar. Hastalığın ortaya çıkış ve yayılışında stres önemli bir faktördür (Harikrishman ve ark., 2010).

A. hydrophila enfeksiyonunun inkübasyon süresi, balık türü ve bağışıklığı ile birlikte çevre koşullarına ve mevsimlere bağlı olarak değişmektedir. İnkübasyon süresinin doğal enfeksiyonlarda 2-4 gün, deneysel enfeksiyonlarda 8-48 saat arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Khallil ve Mansour, 1997; Bulduklu ve ark., 2007; Arda ve ark., 2002; Savaş ve ark., 2006).

Deneysel enfeksiyon oluşturmak için kullanılan bakteri türü *A. hydrophila* suşu (ulaşım numarası :1135, referans numarası: 30:225) Eastern Fish Disease Lab.

West Virginia, Leetw, USA referans laboratuvarından temin edilmiştir. Şekil 3.3’de *A. hydrophila*’ya ait bakteri kolonileri verilmiştir.



Şekil 3.4. *A. hydrophila*’ya Ait Bakteri Kolonileri (orjinal)

Araştırmada ayrıca balıklara ait fotoğrafların çekiminde Canon 350D marka dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır. Bakterilerin ve kan yaymalarının incelenmesinde ve sayımında Olympus CH20 marka ve kan yaymalarının fotoğraflanmasında da Olympus BX51 marka araştırma mikroskobu kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Denemenin Kurgusu

Araştırmada her biri 250 lt olan 12 adet fiberglas deneme tankları kullanılmıştır. Deneme öncesinde dezenfekte edilen tankların her birine 150 lt su doldurulmuş ve tankların üzeri, balıkların atlamalarını önlemek için balık ağı ile örtülmüştür. Tanklar hava kompresörü kullanılarak havalandırılmış, oksijen ve su sıcaklığı YSI marka oksijen metreyle ölçülmüştür.

Su sıcaklığı termostatlı ısıtıcılarla ayarlanmış ve oksijen miktarı $6,0 \pm 0,3$ mg/lt, sıcaklık ise $25,8 \pm 0,2$ °C olarak tüm araştırma boyunca sabit tutulmuştur.

Araştırmada Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Birimindeki, balıklar, makroskopik ve parazitik yönden muayeneden geçirilerek, stok tanklarında adaptasyon amaçlı 1 hafta süreyle bekletilmiş ve bazal yemle beslenmişlerdir. Adaptasyon sonrası deneme tanklarına alınan balıklar, 2. günden itibaren zencefil katkı yemle beslenmeye başlamıştır.

Çalışmada 4 deneme grubu, üç tekrarlı olarak kurgulanmıştır. Kontrol grubu dışında kalan tüm gruplar 90 gün süreyle, farklı oranlarda zencefil ile beslenirken, kontrol grubu bu süre içinde bazal yemle beslenmiştir. Çizelge 3.2.'de denemede kullanılan tank ve balık sayısı, deneme süresi ve *Aeromonas hydrophila* gösterilmiştir.

Grup 1: %0,0 zencefil içeren yemle beslenenler (Kontrol)

Grup 2: %0,1 zencefil içeren yemle beslenenler

Grup 3: %0,5 zencefil içeren yemle beslenenler

Grup 4: %1 zencefil içeren yemle beslenenler

Denemelerde zencefil, 100g yeme 0; 0,1 ml; 0,5 ml ve 1 ml olacak şekilde spreyleme yöntemiyle eklenmiştir. Kontrol ve deneme grupları, günde 2 kez, vücut ağırlıklarının %2'si oranında yemlenmiştir. 90 günlük beslemenin ardından intraperitoneal olarak *A. hydrophila* enjeksiyonu uygulanmıştır. Hastalık belirtilerinin tam olarak gözlemlendiği 5. günde, kan alma işlemi ve analizleri yapılmıştır. Ayrıca nekropsi yöntemiyle iç organ bakılarına da yer verilmiştir.

3.2.2. Yem Katkı Maddesinin Hazırlanması

Ticari olarak piyasadan temin edilen toz zencefil 90 °C'de su banyosunda 2 saat çevirilip filtre edilmiş ve filtrasyon sonrasında ekstrakt liyofilize edilmiştir (Düğenci ve ark., 2003). Üç numara pelet yeme, spreyleme yöntemiyle zencefil (*Z. officinale*) %0,0; %0,1; %0,5 ve %1 oranlarında ilave edilmiş ve yemler laboratuvar ortamında 1 gün boyunca kurutulmuştur. Yem gruplarının kuru madde ve ham kül analizleri yapılmış olup, Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Denemede Kullanılan Yemlerin Kuru Madde ve Ham Kül Değerleri (%)

Gruplar	Kuru Madde (%)	Ham Kül (%)
%0,0 zencefil	91,87	8,13
%0,1 zencefil	91,91	8,09
%0,5 zencefil	91,62	8,38
%1 zencefil	91,05	8,95

3.2.3. Deneysel Enfeksiyonun Oluşturulması

-80 °C derin dondurucuda gliserinli Broth'ta muhafaza edilen *A. hydrophila* stok kültür, +4 °C'ye alınmış ve kültürden alınan bakteri izolatlarının Tryptic Soy Agar (TSA)'a ekilerek 26°C'de 24 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen koloniler Tryptic Soy Broth (TSB)'a aktarılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra TSB'yi uzaklaştırabilmek için; 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilip, sıvı kısım döküldükten sonra üzerine % 9'luk serum fizyolojik eklenmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. 8 adet tüpe 9 ml %9'luk serum fizyolojik eklenerek 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 'lik dilüsyonlar oluşturulmuştur. Her bir dilüsyon tüpünden 0,1ml alınarak, yüzeye yayma yöntemi uygulanmıştır. Bakteri sayısı $1,89 \times 10^9$ cfu/ml olarak belirlenmiş, kontrol ve deneme gruplarındaki balıkların her birine 100µl *A. hydrophila* süspansiyonundan enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat önce yemleme kesilmiştir.

3.2.4. Balıklardan Kan Örneklerinin Alınması

A. hydrophila enjeksiyonunun 5. gününde, balıklar kan alımı öncesinde 10 mg/lt oranında %40'lık fenoksietanol (Sigma, USA)'ün banyo tarzında uygulanmasıyla bayıltılmışlardır (Velisek ve ark., 2007). Bayıltılan balıkların boy ve ağırlıkları alınmış ve vücutları kurulandıktan sonra kan, kuyruk sapı kesilerek alınmıştır. Kan, yapılacak analizin tekniğine uygun olarak EDTA'lı tüplere, mikrohematokrit pipetlere ve yayma amacıyla lamlara alınmıştır.

3.2.5. Eritrosit (RBC) ve Lökosit (WBC) Miktarının Belirlenmesi

Eritrosit ve lökosit hücrelerinin belirlenmesi için, EDTA'lı tüpe alınan kandan, eritrosit pipetinin 0,5 çizgisine kadar çekilmiş, üzerine sulandırma amacı ile 101 çizgisine kadar Natt-Herrick solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra pipet içinde karışan kan ve solüsyon, hücre sayımı için Thoma lamına alınarak, ışık mikroskobunun $\times 40$ büyütmesinde incelenmiştir. Eritrosit hücrelerinin sayımı sırasında thoma lamında bir görüş alanındaki karelerden sol ve sağ üst köşe, sol ve sağ alt köşeler ile ortadan 16'lık küçük bir kare olmak üzere 5 alan sayılıp, 1mm^3 kandaki eritrosit sayısı belirlenmiş ve $(\times 10^6/\text{mm}^3)$ olarak ifade edilmiştir. Buna göre toplam 80 küçük karede sayılan hücre miktarı;

$$\frac{\text{Bulunan hücre sayısı} \times \text{sulandırma oranı}(200) \times 4000}{\text{Sayılan küçük kare adedi}}$$

Sayılan küçük kare adedi

formülü ile belirlenmiştir (Şahan ve Cengizler, 2002; Tanyer, 1985).

Lökosit miktarının belirlenmesinde, lökosit pipetinin 1 çizgisine kadar çekilen kan üzerine 101 çizgisine kadar Natt-Herrick solüsyonu çekilip, karıştırılmıştır. Thoma lamındaki 16 büyük kare üzerine düşen (toplam 256 küçük kare) lökositlerin tamamı sayılmış ve $(\times 10^3 \text{ mm}^3)$ olarak ifade edilmiştir.

Elde edilen toplam eritrosit ve lökosit miktarları ayrı ayrı yukarıda verilen formüle yerleştirilmiş ve 1mm^3 kandaki toplam eritrosit ve lökosit miktarları saptanmıştır (Natt ve Herrick, 1952; Tanyer, 1985 ;Şahan ve Cengizler, 2002; Tavares-Dias ve ark., 2002).

Araştırma için kullanılan Natt-Herrick solüsyonu laboratuvar ortamında aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Natt-Herrick solüsyonu;

3,88 g Sodyum klorür

2,50 g Sodyum sülfat

2,91 g Disodyum fosfat $12\text{H}_2\text{O}$

2,25 g Monopotasylum fosfat

7,50 cc (%37) Formalin

0,10 g Metil kırmızısı

1000 cc Distile su

Solüsyon hazırlandıktan 24 saat sonra süzölmüş, kahverengi şişe içinde ışık almayan bir yerde muhafaza edilmiştir.

3.2.6. Hemoglobin (Hb) Tayini

Araştırmada hemoglobin miktarı tayini için Syanmethemoglobin yöntemi uygulanmıştır. 0,02 ml EDTA'lı kan özel Hb pipeti aracılığı ile deney tüpüne alınmış ve üzerine 5 ml Drabkin solüsyonu eklenmiştir. Drabkin ile deney tüpü içerisindeki kanın karışıp syanmethemoglobine dönüşebilmesi için karışım 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bekletilen kanın bir kısmı alınarak özel spektro küvetlerine konmuş ve spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okumaya alınmıştır. Okunan değer standart skala ile karşılaştırılmış ve skalaya karşılık gelen değer 'g/dl' olarak ifade edilmiştir (Drabkin, 1946; Tanyer, 1985; Şahan ve Cengizler, 2002; Şahan ve Duman, 2010; Mohamad ve abasali 2010). Araştırma için kullanılan Drabkin solüsyonu laboratuvar ortamında aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Drabkin solüsyonu;

50 mg Potasyum cyanid

1,0 g Sodyum bikarbonat

200 mg Potasyum ferricyanid

1000cc Distile su

karışımlarından elde edilen Drabkin solüsyonu kahverengi bir şişe içinde ışık almayan bir yerde muhafaza edilmiştir.

3.2.7. Hematokrit (Hct) Tayini

Araştırmada Hct tayini için Mikrohematokrit teknikten yararlanılmıştır (Tanyer, 1985). Hematokrit tayininde kanın pıhtılaşması istenmediğinden heparinli kılcal pipetlere (mikrohematokrit pipetler) $\frac{3}{4}$ 'üne kadar kan doldurarak, diğer ucu cam macunıyla kapatılmıştır. Her balık örneği için 4 adet hematokrit pipet

hazırlanmıştır. Hazırlanan pipetler 11.000 rpm hızda 5 dakika çevrilmiştir. Okunan değer özel skalada okunmuş ve kanın yüzdesi (%) olarak ifade edilmiştir. % Hematokrit değer aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Şahan ve Cengizler, 2002; Tanyer, 1985).

$$\% \text{ Hematokrit} = \frac{\text{Kanın şekilli elemanlarının hacmi}}{\text{Toplam kan hacmi}} \times 100$$

3.2.8. Lökosit Hücre Formülleri Tayini (%)

Balıkların kuyruk bölgesinden direk lama alınan kandan her balıktan 4 preparat olacak şekilde yaymalar hazırlanmış ve preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar, önce May-Grünwald boyası ile 5 dakika boyandıktan sonra distile su ile yıkanmıştır. Ardından 20 dakika Giemsa boyası ile boyanmış sonra distile su ile yıkanmıştır. Boyanan preparatlar kuruduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobunun (x100) büyütmesinde incelenmiştir. 100 lökosit hücrelerine denk gelecek şekilde sayılan lenfosit, monosit, nötrofil ve eosinofil hücre sonuçları yüzde (%) olarak verilmiştir (Şahan ve Cengizler, 2002; Tanyer, 1985; Kocabatmaz ve Ekingen, 1987).

3.3. İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen veriler One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler, zencefilin hem birbiriyle hem de kontrol grubu ile olan ilişkisinin belirlenmesi şeklinde olmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0,05 önem düzeyinde Duncan testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler SPSS 17 paket programı kullanılarak yapılmıştır (Erol, 2010).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Enfekte Balıkların Klinik ve Nekropsi Bulguları

90 günlük yemleme sonunda ortalama ağırlıkları $76,56 \pm 2,97$ g ve ortalama boyları $15,71 \pm 0,19$ cm olan balıklara, intraperitoneal olarak *A. hydrophila* enjeksiyonu yapılmıştır.

Aeromonas hydrophila enjeksiyonundan, 48 saat sonra balıklarda durgunluk, yem almada isteksizlik, suyun dışına çıkma isteği, yüzgeç tabanında hiperemik alanlar, özellikle kuyruk ile yüzgeç uçlarında erimeler ve bakteri enjeksiyonuna bağlı renk değişimlerinin başladığı gözlenmiştir. 4. günün sonunda, özellikle kontrol grubu (%0,0 zencefil) balıklarında yem almada isteksizlik, tankın tabanında toplanma ve yüzmede bozukluklar, yüzgeç tabanında hiperemik alanlar (Şekil 4.1) ile yüzgeçlerde erimeler (Şekil 4.2) belirlenmiştir.

Enfeksiyonun 5. gününde, yapılan nekropsi sonucuna göre özellikle kontrol grubu balıklarda, solungaç filamentlerinde erime, yapışma ve mukus birikimi (Şekil 4.3), karaciğerde yağlanma, dokuda büyüme ve renk değişimi, bağırsaklarda yağlanma, sıvı birikimi, safra kesesinde renk değişimi (Şekil 4.4) ve böbrek dokuda hiperemik alanlar gözlenmiştir.

Nekropsi yapılan ve hastalık semptomlarını gösteren tüm gruplardan; karaciğer, böbrek, intraperitoneal sıvı ve solungaçlardan TSA besiyerine reizole bakteri ekimi yapılmıştır. Bakterilerin inkübasyonu sonrasında tüm deneme gruplarında tek tür bakterinin ürediği gözlenmiştir. Üremiş olan bakteri türünün yapılan bazı fizyolojik biyokimyasal testler sonucunda *Aeromonas hydrophila* olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

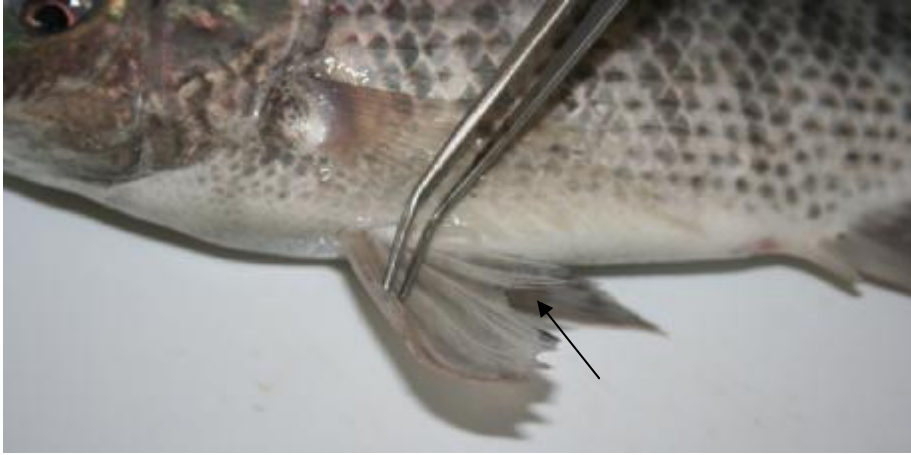
Çizelge 4.1. *Aeromonas hydrophila*'ya ait Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler

Özellikler	<i>A. hydrophila</i>
Hareketlilik	+
Gram Boyama	-
Katalaz	+
Amilaz	+
Glukoz	+
Laktoz	-
Gelişme 26 °C	+

5. günün sonunda yapılan analizler sonrasında, balıkların beslenmesine devam edilmiştir. Bu süreçte, yüzgeçlerde ileri düzeyde erime ve deformasyonlar, pullarda dökülme ve balıklarda anoreksiya izlenmiştir. 14. günde zencefil içermeyen kontrol grubunda, ileriki günlerde giderek artan ölüm vakaları kaydedilmiştir.



Şekil 4.1. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*'ta Yüzgeç Tabanlarında Hiperemik Alanlar (orjinal)



Şekil 4.2. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*'ta Yüzgeç Uçlarında Erimeler (orjinal)



Şekil 4.3. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*'ta Solungaçların Genel Görünümü (orjinal)



Şekil 4.4. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*'ta İç Organlar (orjinal)

4.1.2. Hematolojik Bulgular

4.1.2.1. Eritrosit Değerleri

Eritrosit miktarı açısından, kontrol grubu ile %0,5 zencefil grubu arasındaki artışın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer zencefil içeren deneme grupları arasındaki farkın ise önemli olmadığı, birbirine yakın değerler gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.2). Şekil 4.5’de grafikte ifade edilmiştir.

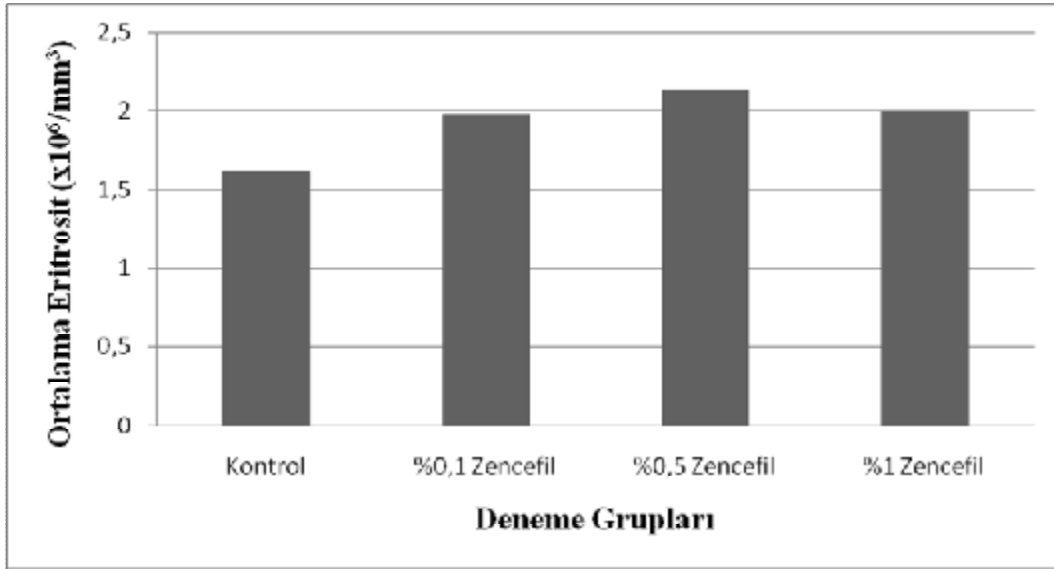
Çizelge 4.2. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*’larda RBC, Hb ve Hct Ortalamaları

Gruplar Parametreler	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	%0,1 Zencefil $\bar{X} \pm SD$	%0,5 Zencefil $\bar{X} \pm SD$	%1 Zencefil $\bar{X} \pm SD$
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	1,62 $\pm$ 0,45 ^a	1,98 $\pm$ 0,33 ^{ab}	2,13 $\pm$ 0,27 ^b	2,00 $\pm$ 0,24 ^{ab}
Hb (g/dL)	7,99 $\pm$ 1,00 ^a	8,29 $\pm$ 1,15 ^a	8,24 $\pm$ 1,10 ^a	8,00 $\pm$ 1,02 ^a
Hct (%)	32,16 $\pm$ 3,31 ^a	36,97 $\pm$ 4,04 ^b	40,41 $\pm$ 3,72 ^c	40,04 $\pm$ 2,14 ^c

a, b ve c: Aynı satırda benzer harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemsiz ($p>0,05$),

Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).

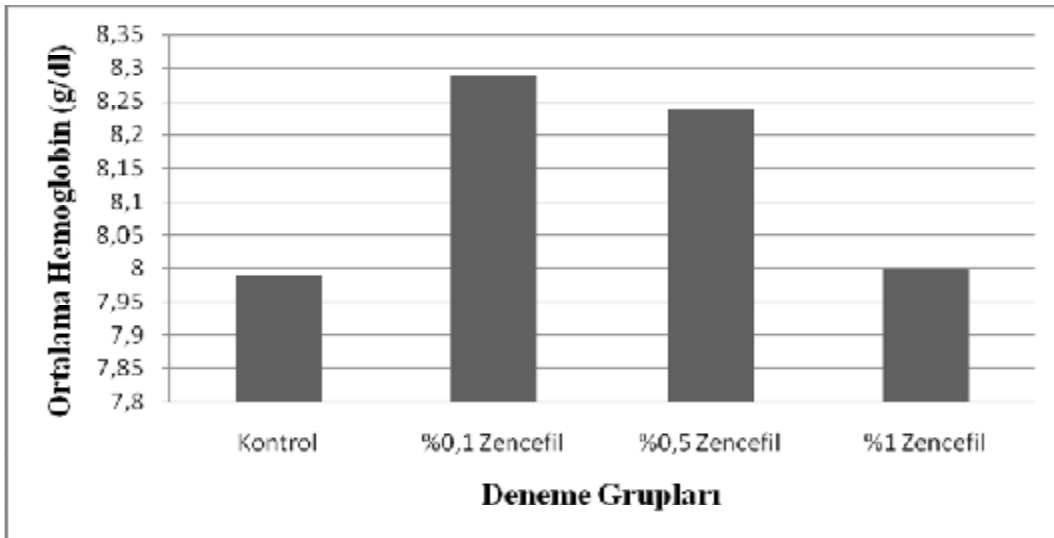
$\bar{X} \pm SD$: Ortalama $\pm$ Standart Sapma



Şekil 4.5. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*'larda Ortalama Eritrosit Değerleri ($\times 10^6/\text{mm}^3$).

4.1.2.2. Hemoglobin Değerleri

Hemoglobin değerleri ile ilgili yapılan analizlerde gerek kontrol ile deneme grupları arasında, gerekse deneme grupları içinde önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.2) . Şekil 4.6'de ki grafikte de ifade edilmiştir.

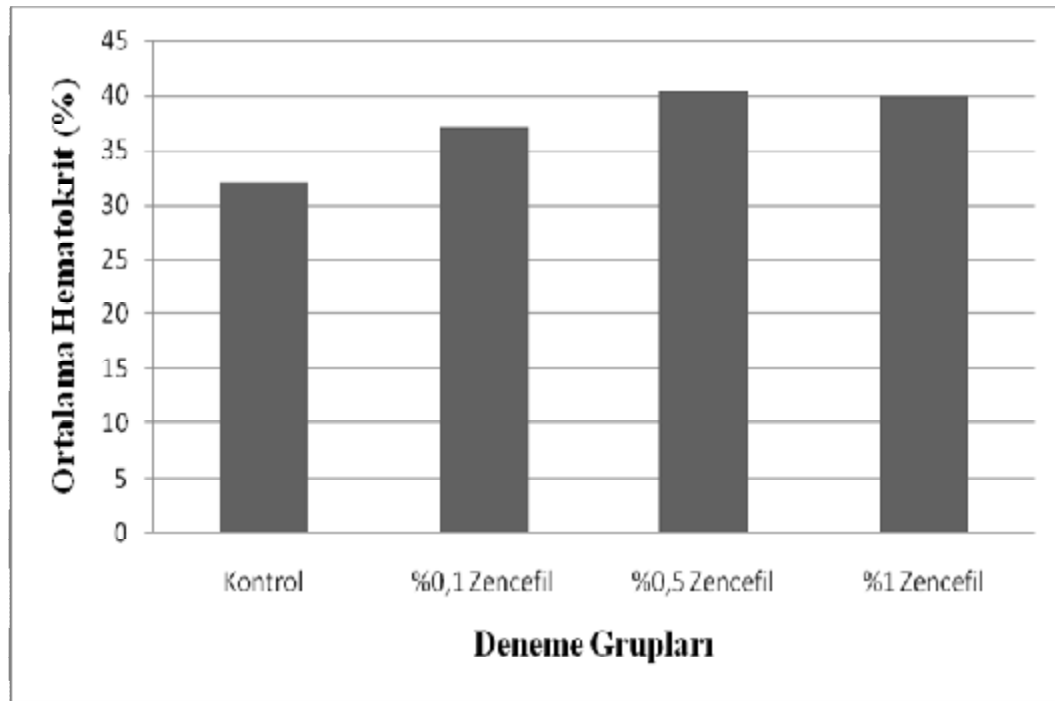


Şekil 4.6. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*'larda Ortalama Hemoglobin Değerleri (g/dl)

4.1.2.3. Hematokrit Değerleri

Hematokrit yüzdeleri açısından, kontrol ile %0,1; %0,5 ve %1 zencefil içeren gruplar arasında önemli fark olduğu ($p<0,05$), ayrıca %0,1 zencefilli grup ile %0,5 ve %1 zencefil içeren gruplar arasında ki artışın da önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Deneme ve kontrol grubu balıklarda belirlenen hematokrit ortalamaları Çizelge 4.2’de ve bu verilere ait sütun grafiği de Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*’larda Ortalama Hematokrit Değerleri (%).

4.1.2.4. Lökosit Değerleri

Lökosit değerleri açısından, kontrol grubu ile % 0,5 ve % 1 zencefil grupları arasında önemli artışlar kaydedilmiştir ($p<0,05$). %0,5 ve %1 zencefil içeren grup benzer değerler gösterip, %0,1 zencefil içeren gruptan daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.3). Şekil 4.8’de verilen grafikte ifade edilmiştir.

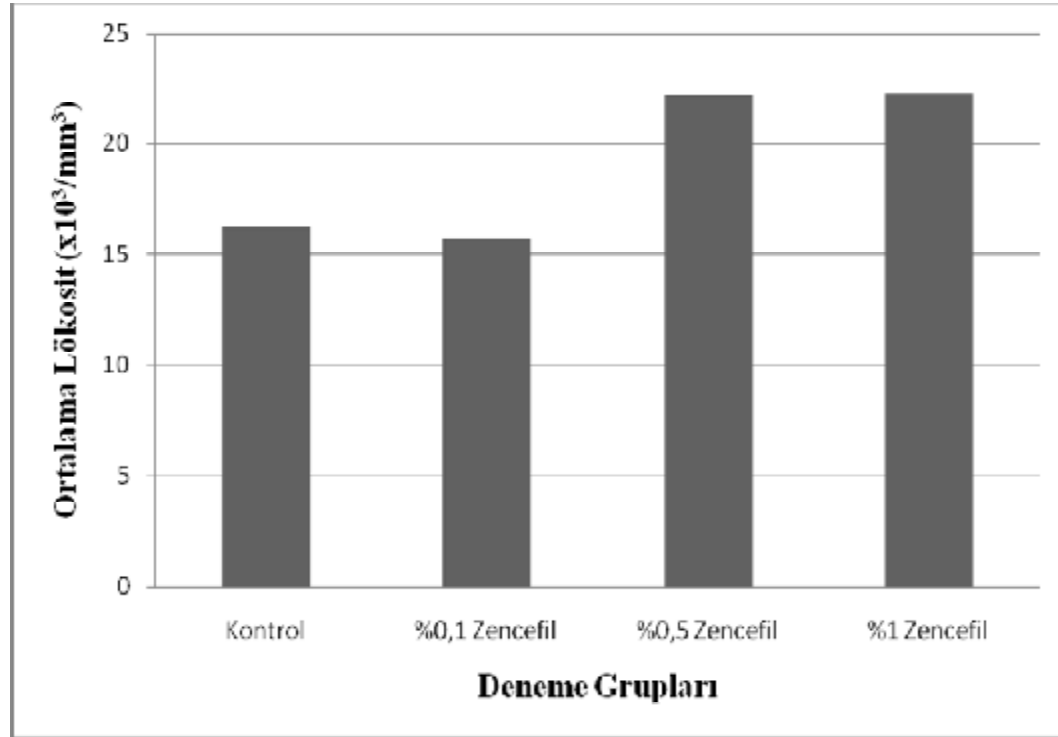
Çizelge 4.3. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*'larda WBC Değerleri

Gruplar	Kontrol	%0,1 Zencefil	%0,5 Zencefil	%1 Zencefil
Parametre	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	16,22 $\pm$ 2,51 ^a	15,72 $\pm$ 5,79 ^a	22,22 $\pm$ 4,50 ^b	22,27 $\pm$ 6,47 ^b

a ve b: Aynı satırda benzer harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemsiz ($p > 0,05$)

Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$)

$\bar{X} \pm SD$: Ortalama $\pm$ Standart Sapma



Şekil 4.8. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*'larda Ortalama Lökosit Değerleri ($\times 10^3/\text{mm}^3$)

4.1.2.5. Lökosit Hücre Formülleri

Deneme ve kontrol grupları kan yaymalarının lökosit hücre formülleri (lenfosit, monosit, nötrofil ve ösinofil)'ne ait veriler Çizelge 4.4'de ve Şekil 4.9 'da ki grafikte ifade edilmiştir.

Çizelge 4.4. *A. hydrophila* ile Enfekte *O. niloticus*'larda Lökosit Hücre Formülleri (%)

Gruplar Lökosit Hücre Formülleri (%)	Kontrol $X \pm SD$	%0,1 Zencefil $X \pm SD$	%0,5 Zencefil $X \pm SD$	%1 Zencefil $X \pm SD$
Lenfosit	53,39 $\pm$ 3,40 ^b	53,05 $\pm$ 4,70 ^b	50,39 $\pm$ 3,04 ^b	41,62 $\pm$ 2,06 ^a
Monosit	44,76 $\pm$ 4,21 ^a	42,32 $\pm$ 3,74 ^a	46,17 $\pm$ 3,11 ^a	57,40 $\pm$ 7,02 ^b
Nötrofil	1,85 $\pm$ 2,24 ^a	4,10 $\pm$ 2,90 ^a	3,00 $\pm$ 1,84 ^a	1,71 $\pm$ 1,63 ^a
Ösinofil	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	0,54 $\pm$ 1,18 ^{ab}	1,68 $\pm$ 1,69 ^b	0,94 $\pm$ 1,37 ^{ab}

a ve b: Aynı satırda benzer harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemsiz ($p>0,05$),

Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).

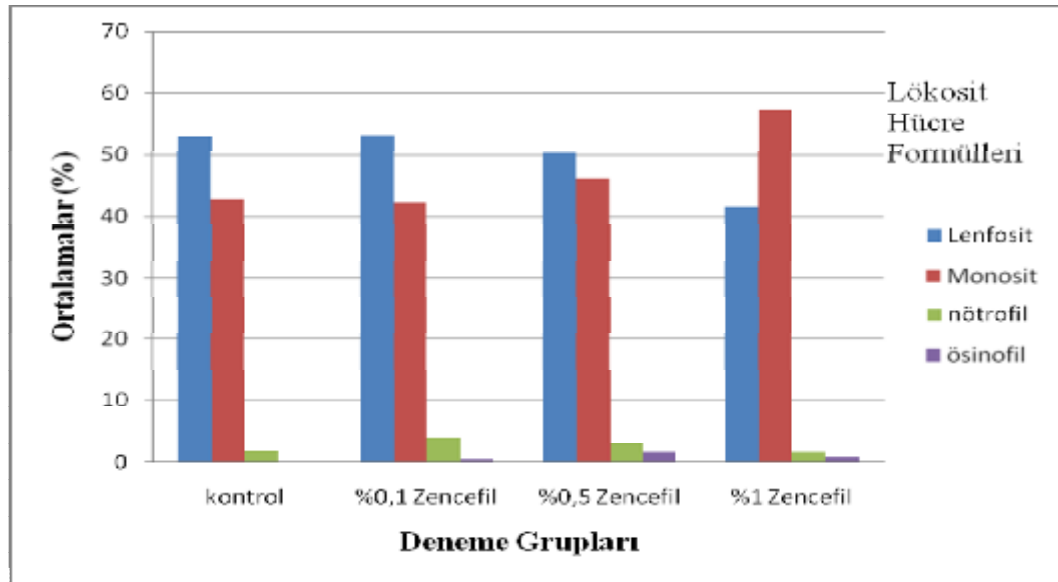
$X \pm SD$: Ortalama $\pm$ Standart Sapma

Lenfosit yüzdeleri açısından, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %1 zencefil içeren grupta azalma kaydedilmiştir ($p<0,05$). Diğer yandan kontrol ile %0,1 ve %0,5 zencefil içeren grupta görülen azalma önemsiz ($p>0,05$) olarak değerlendirilmiştir. %1 zencefil içeren grubun, lökosit yüzdelerindeki azalmanın ise önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 4.4) (Şekil 4.9).

Monosit yüzdeleri açısından, kontrol grubu ile %1 zencefil içeren grup arasındaki artış önemli ($p<0,05$), ancak kontrol ile %0,1 ve %0,5 zencefil içeren gruplar arasında ki fark önemsiz olarak kaydedilmiştir ($p>0,05$). %1 zencefil içeren grup ile diğer zencefilli deneme grupları arasındaki farkın önemli olduğu ($p<0,05$) ve %1 zencefil içeren grubun monosit ortalamasının yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4) (Şekil 4.9).

Nötrofil ortalamaları açısından, kontrol grubu ile zencefilli deneme grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuş ($p>0,05$), ayrıca deneme grupları ortalamalarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4) (Şekil 4.9).

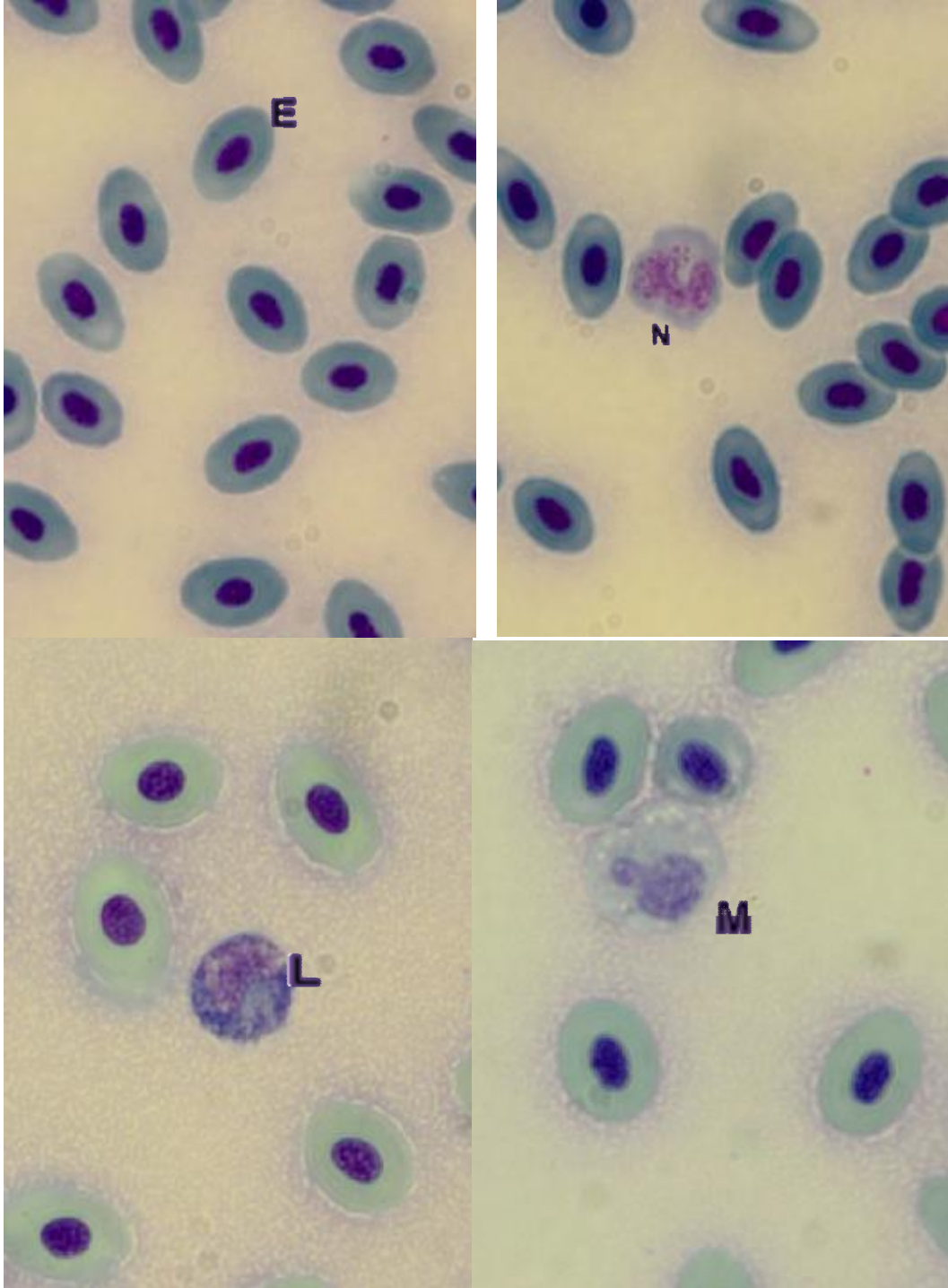
Ösinofil ortalamaları, kontrol ile %0,5 zencefil içeren grup arasındaki değer artışlarının önemli olduğu ($p<0,05$) ve deneme grupları ortalamalarının benzer olduğu bulunmuştur ($p>0,05$) (Çizelge 4.4) (Şekil 4.9).



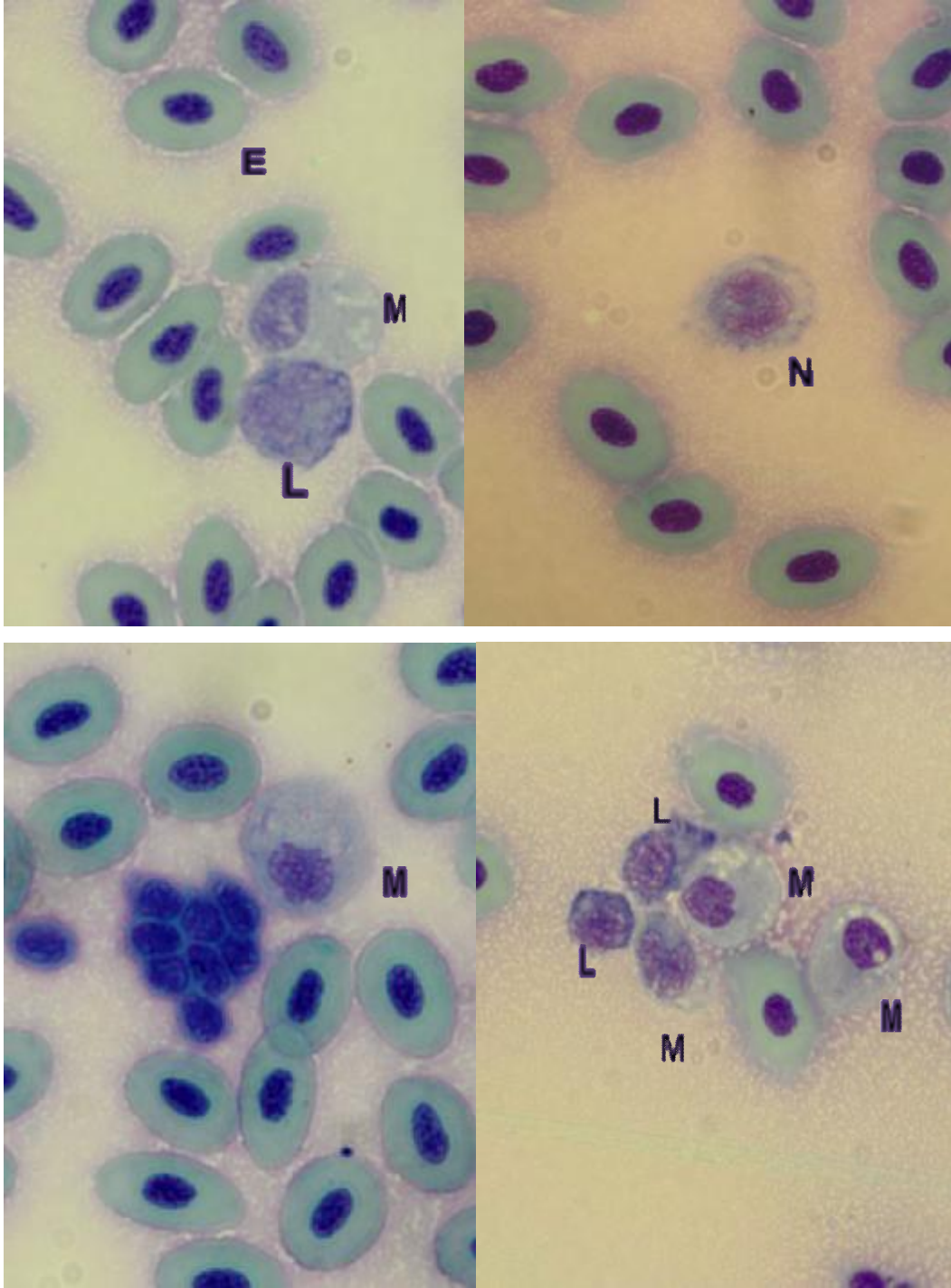
Şekil 4.9. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*'lerden Elde Edilen Lökosit Hücre Formülleri (%).

4.1.2.6. Kan Yaymaları

Deneme gruplarına ait yayma preparatları Şekil 4.10 ve 4.11'de verilmiştir. %0,0; %0,1; %0,5 ve %1 zencefil içeren gruplarda *A. hydrophila* enjeksiyonu sonrasında, kan hücrelerinin yapılarında herhangi bir bozulma saptanmamıştır.



şekil 4.10. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*'lardan Elde Edilen Eritrosit (E), Lenfosit (L), Monosit (M) ve Nötrofil (N) Hücreler(x100) (orijinal).



şekil 4.11. *A. hydrophila* ile Enfekte Edilmiş *O. niloticus*'lardan Elde Edilen Eritrosit (E), Lenfosit (L), Monosit (M) ve Nötrofil (N) Hücreler (x100) (orijinal)

4.2.Tartışma

Kan, bir canlının metabolizmasında meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri tam olarak yansıtan bir dokudur (Dörücü ve ark., 2005). Balıklarda kan analizleri, metabolik bozukluklar ve sepsisemik hastalıkların tespitinde geniş bir uygulama alanı yaratmıştır. Dolayısıyla kan, immünoestimülantların ve enfeksiyonların yarattığı etkilerin ortaya konulması bakımından da önemlidir (Anderson, 1992). Nil Tilapia (*O. niloticus*)’sında zencefilin meydana getirdiği etkiler üzerine herhangi bir çalışma bulunmayıp, çalışmamızda farklı balık türleri ve farklı immünoestimülant çalışmalarına ise tartışma bölümünde yer verilmiştir. Çalışma konuları bulgular kısmında ele alınıp sırasına göre, aşağıda tartışılmıştır.

4.2.1. Enfekte Balıklarda Nekropsi

A. hydrophila’nın Nil Tilapia (*O. niloticus*)’larında yüzeysel deri lezyonları, yüzgeç diplerinde ve operkulum kapağında hiperemi, yüzme bozukluğu, renkte koyulaşma, eksoftalmus ve doku yıkımlarıyla beraber, karaciğerde hemorajik odaklar, renk koyulaşması, yağlanma; böbrekte hiperemik alanlar, mide ve bağırsakta sarımsı jelöz bir sıvı oluşturduğu bildirilmiştir (Yardımcı ve Aydın, 2011; Harikrishnan ve Balasundaram, 2005; Cipriano, 2001).

Çalışmamızda, *Aeromonas hydrophila* ile enfekte edilen balıklarda görülen semptomların çeşitli araştırmacılar (Harikrishnan ve Balasundaram, 2005; Cipriano, 2001) tarafından bildirilmiş semptomlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Fakat araştırmacıların bildirdikleri yüzeysel deri lezyonları, eksoftalmus gibi olumsuzluklar çalışmamızda yer alan enfeksiyonun 5. gününe kadar görülmemiş, ancak hastalığın kronik aşamasında beklenen semptomlar olarak değerlendirilmiştir.

4.2.2. Eritrosit Değerleri

Kemikli balıklarda eritrositler, baş böbrek ve dalağın korteks (dış kısmı) bölümünde üretilir. Türe göre değişiklik göstermekle birlikte, çalışma balığı olan

Tilapia'larda 1mm^3 kandaki ortalama eritrosit miktarı $2,16 \times 10^6$ olarak belirtilmiştir (Azizoğlu ve Cengizler, 1996). Yapılan farklı çalışmalarda eritrosit hücrelerin yem içeriklerine, enfeksiyonlara ve enfestasyonlara karşı hızlı yanıt verdiği bildirilmiştir (Ekingen 1988; Azizoğlu ve Cengizler, 1996). Zencefilli grup (%0,5-%1) lardan elde edilen yüksek eritrosit değerlerinin, Azizoğlu ve Cengizler (1996)'ın belirttiği, sağlıklı Nil Tilapia'larındaki eritrosit değerler ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, zencefilsiz olarak temel aldığımız kontrol grubunda yer alan Tilapia'ların eritrosit değerleri ile zencefilli gruplar arasındaki artışların önemli düzeyde olduğu kaydedilmiştir.

Abdel-tawwab ve ark. (2008), *A. hydrophila* ile enfekte olan Nil Tilapia (*O. niloticus*)'sı yemlerine 5; 7,5 ve 10 g/kg oranındaki spirulina ilavesinin eritrosit değerlerinde anlamlı farklar oluşturduğunu bildirmişlerdir. 5g/kg spirulina eklenmiş grubun eritrosit değerine ($2,37 \times 10^5/\mu\text{l}$) etkisi, çalışmamızdaki %0,5'lik zencefillin eritrosit değerlerine ($2,13 \times 10^6/\text{mm}^3$) etkiyle benzer görülmüş ve her iki immünostimülantın da eritrosit üretimini tetiklediği tespit edilmiştir.

Nya ve Austin (2009), *A. hydrophila*'yla enfekte Gökkuşaağı Alabalığı (*O. mykiss*) yemlerine zencefil (*Z. officinale*) uygulaması çalışmasında, %1 zencefil içeren grubun eritrosit ortalaması, %0,5 zencefil içeren gruptan yüksek bulunmuştur. Araştırmacıların elde ettiği eritrosit değerleri çalışma bulgularımızla benzerlik gösterse de, Nil Tilapia'sında en yüksek eritrosit seviyesi ($2,13 \times 10^6/\text{mm}^3$) %0,5 zencefil içeren grupta tespit edilmiştir.

Ancak, eritrosit değerlerde alabalıkta %1'lik zencefil, Nil Tilapia'sında ise %0,5'lik grupta izlenen artışlar, farklı çevresel isteklere sahip iki farklı türün metabolik aktivite farklılıklarına dayandırılmıştır.

Abdel-tawwab ve ark. (2010), *A. hydrophila* ile enfekte olan Nil Tilapia (*O. niloticus*)'sı yemlerine yeşil çay eklenmiş ve buna göre eritrosit miktarının en yüksek ($2,20 \times 10^6/\text{mm}^3$) 0,5; 1 ve 2 g/kg yeşil çaylı gruplardan elde edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda %0,5 zencefilli grupta yeşil çayın farklı oranlarda ulaşılan değerlerine yakın sonuçlar bulunmuştur. Zencefile nazaran yeşil çayın balıkta eritrosit etkinliğini daha fazla tetiklediğini tespit etmişlerdir.

Şahan ve Duman (2010), sağlıklı Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larına uyguladıkları %1 ve %5 (1-3) β gluklan içeriğinin, eritrosit ortalamasını artırdığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızdaki %0,5 ($2,13 \times 10^6/\text{mm}^3$) ve %1 ($2,00 \times 10^6/\text{mm}^3$)'lik zencefilli grupların eritrosit miktarları, %5'lik β gluklan içeren grup ($2,295 \times 10^6/\text{mm}^3$) ile benzerlik göstermektedir. Araştırmamızda, enfeksiyonlu balıklarda zencefilin düşük dozlarında dahi eritrosit üretiminde önemli artışlar gözlenmiştir. Bunun β gluklan uygulanan sağlıklı balıkların eritrosit miktarından farklı olmadığı belirlenmiştir.

Thanikachalam ve ark. (2010) *A. hydrophila* ile enfekte edilen Africa Kedi Balık (*Clarias gariepinus*)'larına %0,5; %1; %1,5 sarımsak katkısının, kedi balıklarında eritrosit ortalamasını oldukça yükselttiğini bildirmişlerdir. Eritrosit miktarı açısından çalışmamızla benzerlik görülmüştür. %1 ve %1,5 sarımsaklı gruplarda artışın devam etmesine rağmen, çalışmamızda eritrosit değerleri açısından en ideal dozun %0,5'lik zencefil olduğu saptanmıştır.

Mohamad ve Abasali (2010), farklı bitki ekstraktların *A. hydrophila* ile enfekte Sazan (*C. carpio*)'ların bağışıklığına etkisini araştırmışlardır. Bitki karışımını yemlere 0, 100, 250, 500, 750, 1000mg/kg olarak eklemişler ve 20.; 40.; 60. güne kadar eritrosit ortalamasının tüm gruplarda arttığını tespit etmişlerdir. 60. günden sonra yaptıkları *A. hydrophila* ile enfekte edilen balıklarda 70. günde enfeksiyona bağlı eritrosit oranlarının düştüğünü bildirmişlerdir. Enjeksiyon sonrasında 250; 500; 750 ve 1000mg/kg bitki karışımı içeren grupların eritrosit ortalamaları çalışmamızdaki %0,5 ve %1 zencefil içeren grupların eritrosit ortalamaları ile benzerlik göstermiştir. 750mg ve 1000mg bitki karışımı arasındaki eritrosit ortalamasındaki düşüş çalışmamızdaki %0,5 ve %1 zencefilli gruplar arasında da tespit edilmiştir.

Bazı immünostimülantların dozlarındaki artışın eritrosit hücreler üzerine fazla etki göstermediği, doz artırmak yerine, ideal dozu belirleyip, uygulamanın daha sağlıklı sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

4.2.3. Hemoglobin Değerleri

Kanın hemoglobin değeri, eritrosit hücrelerinde yer alan kanın oksijen bağlama kapasitesini gösteren bir parametredir. Hemoglobin solunumla elde edilen çözünmüş O₂ ve CO₂'i kendine bağlayarak taşır (Goda, 2008).

Çalışmamızda kontrol ve deneme grupları arasında hemoglobin ortalamaları birbirine benzer değerler göstermiştir ($p>0,05$).

Şahan ve Duman (2010), sağlıklı Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larına uygulanan β glukun (%0,1 ve %0,5)'in, çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde, hemoglobin değerlerini etkilemediğini belirlemişlerdir.

Nya ve Austin (2009), *A. hydrophila* ile enfekte edilen Gökkuşığı Alabalık (*O. mykiss*)'lerinin yemlerine zencefil eklemenin, kontrol ve deneme grupları arasında hemoglobin değerlerini değiştirmedini bildirmişlerdir.

Nya ve ark. (2010), *A. hydrophila* ile enfekte edilmiş Gökkuşığı Alabalık (*O. mykiss*)'larına allicin uygulamasının hemoglobin ortalamalarında değişiklik yaratmadığını tespit etmişlerdir.

Yapılan önceki çalışmalarda da gözlemlendiği gibi, balıklarda immünostimülant uygulamalarının eritrositlerdeki hemoglobinin oksijen taşıma kapasitesinde herhangi bir değişiklik yaratmadığı yönündedir.

4.2.4. Hematokrit Değerleri

Balık sağlığı hakkında ipuçları veren, aneminin belirlenmesinde de kullanılan parametredir. Ancak, yapılan çalışmalarda immünostimülantların hematokrit üzerine çok etkili olmadığı bildirilmiştir (Anderson, 1992).

Sarıhan ve Cengizler (2005), *Streptococcus iniae* enfeksiyonu sonrası Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında levamisol (5; 7,5; 12,5µg/ml) uygulamasının 7.; 14.; 21. ve 28. günlerde hematokrit değerleri üzerinde etkili olmadığını, levamisol'ün balıklar üzerindeki etkinliğinin azalmasıyla 28. gündeki hematokrit ortalamasının giderek düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmada immünostimülant uygulama süresi ve dozunun hematokrit değerini değiştirdiği düşünülmektedir.

Abd-El-Rahman (2009), çalışmasında Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında *A. hydrophila*'ya karşı uyguladığı ham propolis ve etanolik-propolis-ekstraktının hematokrit ortalamasını önemli düzeyde artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda tüm zencefil içeren gruplarda hematokrit ortalamalarının, bu çalışmadaki miktarlara benzer artış gösterdiği bildirmiştir.

Dörücü ve ark. (2009), çalışmalarında Gökkuşluğu Alabalık (*O. mykiss*)'larında %5 çörek otunun diğer gruplara(%1; %2,5 çörek otu) göre hematokrit ortalamasını olumlu etkilediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kontrol grubuyla tüm deneme grupları arasındaki farkın önemli olduğu, zencefilin balıklarda da diğer hayvanlarda olduğu gibi hematopoetik organları uyarıcı etkisinin bulunduğu görülmektedir (Nakazawa ve Ohsawa, 2002).

Aly ve ark. (2008), *Pseudomonas fluorescens* ile enfekte edilmiş Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında 0,25 ppt ekinezya ekstraktının hematokrit ortalamasını kontrol grubuna göre artırdığı ve bu artışın önemli olduğunu bildirmişlerdir. 0,25 ppt'lik ekinezya ekstraktının hematokrit ortalamasını %31,48 bulmuşlardır. Çalışmamızda zencefil içeren tüm gruplar da hematokrit ortalaması %36,97 ile %40,41 olarak kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. hematokrit değeri açısından Aly ve ark. (2008)'nın ekinezya ekstraktı için yaptıkları çalışma zencefil içeren çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir.

4.2.5. Lökosit Değerleri

Kemikli balıklarda lökosit hücreler, dalağın medulla (iç kısmı) bölümünde üretilir. Türe göre değişiklik göstermekle birlikte, çalışma balığı olan Tilapia'larda 1mm^3 kandaki ortalama lökosit miktarı $22,6-77,5 \times 10^3$ arasında bildirilmiştir (Azizoğlu ve Cengizler, 1996). Zencefilli grup (%0,5-%1) lardan elde edilen yüksek lökosit değerlerinin, Azizoğlu ve Cengizler (1996)'in belirttiği, sağlıklı Nil Tilapia'larındaki lökosit değerleri ile benzerlik göstermiştir. Ancak, çalışmamızda kontrol grubunda yer alan Tilapia'ların lökosit değerleri ile zencefilli gruplar arasındaki artışların önemli düzeyde bildirilmiştir.

Lökositler granüler ve agranüler hücreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu hücreler genel olarak fagositoz yapan, antijenik uyarılara karşı antikor oluşturan, immün sistemde işlevsel göreve sahiptirler (Houston, 1997).

Gopalakannan ve Arul (2006), çalışmalarında kitin, kitosan ve levamisol ile beslenen Sazan (*C. carpio*)'ların *A. hydrophila* ile 45 gün sonra enfekte edildiklerinde 60. günde ($34,2 \times 10^3/\text{mm}^3$) ve 90. günde ($33,2 \times 10^3/\text{mm}^3$) kitin içeren grubun lökosit ortalamalarının en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarımız bu araştırmayla paralellik göstermiş olup, kontrole ($16,23 \times 10^3/\text{mm}^3$) göre zencefilli deneme gruplarında lökosit miktarının daha yüksek olduğu ($22,27 \times 10^3/\text{mm}^3$) bildirilmiştir.

Sahu ve ark. (2007), *A. hydrophila* ile enfekte olmuş *Labeo rohita*'lara, 5g/kg ve 10g/kg sarımsak içeriği uygulamışlar, sonuçta lökosit hücrelerindeki artışı önemli bulmuşlardır. Bu sonuçlarla, çalışmamızdaki %0,5 ve %1 zencefil içeren gruplarının lökosit miktarındaki artışlar benzerlik göstermektedir.

Dörücü ve ark. (2009), Gökkuşığı Alabalık (*O. mykiss*)'larında çörek otu uygulamasında, kontrol ve çörek otu grupların lökosit ortalamaları arasında önem bulunmadığını tespit etmişlerdir. Lökosit sayıları, patojenin balığa geçişiyle yükselebilir, buna bağlı olarak doğal olmayan bağışıklık sistemi mekanizmaları da devreye girer. Lökositlerde artış olmaması, balıkta herhangi bir tehdit unsurunun olmadığı anlamına gelir. Çalışmamızda lökositlerde görülen artış, zencefilin lenfoid dokular üzerinde yarattığı etkinin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

Mohamad ve Abasali (2010), farklı bitki ekstraktlarını Sazan (*C. carpio*)'larda *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı uyguladıklarında, lökosit ortalamasının enfeksiyondan önce daha yüksek, sonra ise azaldığını tespit etmişlerdir. Fakat enfeksiyondan sonra deneme gruplarında ekstrakt oranı arttıkça lökosit oranının arttığını görmüşlerdir. 250 ve 1000mg arasında ki bitki ekstraktlı grupların lökosit miktarı çalışmamızdaki %0,5 ve %1 zencefilli gruplardaki değerlerle ($22,27 \times 10^3/\text{mm}^3$) benzer görülmüştür. Lökosit hücre miktarının, bitki ekstraktlarındaki doz artışı ile artış gösterdiği belirlenmiştir.

Thanikachalam ve ark. (2010), Afrika Kedi Balık (*Clarias gariepinus*)'larında *A. hydrophila*'ya karşı kullanılan sarımsağın lökosit ortalamasını

olumlu etkilediği ve kontrole göre deneme gruplarına ait lökosit miktarlarının oldukça yüksek olduğunu bulmuşlardır. Kontrol ve %0,5; %1 ve %1,5 sarımsak içeren grupların lökosit ortalamalarının $20-41 \times 10^3/\text{mm}^3$ arasında yer aldığı bildirilmektedir. Oransal olarak çalışmamızdaki deneme gruplarında görülen artışla benzerlik gösterse de, deneme gruplarımızda lökosit ortalamaları bu değerlerde görülmemiştir. Balıkların türsel farklılığı, örneklemelerin enfeksiyondan ne kadar zaman sonra yapıldığı çalışmacıların elde ettiği lökosit değeri açısından değerlendirebilecek olası faktörlerdir.

4.2.6. Lökosit Hücre Formülleri

Balıklarda lökositler agranüler ve granüler hücreler olarak ele alınır. Agranüler hücreler; lenfosit ve monosit, granüler hücreler ise nötrofil, ösinofil ve bazofil hücrelerdir.

Lenfositler antijenik maddelere karşı antikor salgılanmasını, monositler makrofaj oluşumunu yaparken, granüler hücreler antijenleri fagosit edici özelliğe sahiptirler. Lökositlerin yüzde oranlarının saptanması, hastalıkların ayırt edilmesinde kullanılan bir parametredir (Çağırğan, 1990)

Lökosit üretiminde artışların yaşanması, enfeksiyonun akut ve kronik aşamalarda farklı seyretmesinden kaynaklanır. Araştırmamızda deneme grupları içinde lenfosit ortalamaları arasında fark izlenmemiştir.

Monositler, bilindiği gibi dokulara geçerek dokularda oluşan patojeni fagosit ederler. Çalışmamızda %1'lik zencefil grubunda yer alan monositlerin gösterdiği artış, iç organlarda enfeksiyona bağlı dokusal hasarların giderilmesi, aynı zamanda lenfoid dokuların daha fazla uyarıldığının göstergesidir.

Abdel- tawwab ve ark. (2010) *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larına yeşil çay eklenmiş yemlerin granülosit ortalamaları arasındaki farkı önemsiz olarak tespit etmişlerdir. yeşil çayın granülosit oluşumunu tetiklemediği ve hatta granülosit ortalamalarının yeşil çayın farklı oranlarında dahi kontrolden daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Abdel- tawwab ve ark. (2008), Hrubec ve ark. (2000) Hibrit Tilapia (*O. hybrid*)'larda, Dobsikova ve ark. (2006)

Sazanlar (*C. carpio*)’da ve Goda (2008) Nil Tilapia’larında farklı bitkisel immünostimülantlarla elde ettikleri granülosit oluşumunu düşük bulmuşlardır.

Çalışmamızda, nötrofil ortalamalarının (%1-4) tüm deneme gruplarında birbirine benzer olduğu ve aralarındaki farkın da önemsiz olduğu görülmüştür. Çalışmada nötrofillerin henüz fagositoz için yüksek miktarda uyarılmamış olduğu ve enfeksiyonun kronik bir aşamada olmayışı nötrofillerin miktarında önemsiz artışlara neden olmuştur.

Ösinofil ortalamalarının, deneme grupları arasında yalnızca %0,5 zencefil içeren grupta (%1,68) önemli olduğu gözlenmiştir. Ösinofil miktarı açısından etkin dozun, %0,5’lik zencefil olduğu belirlenmiştir.

Kocabatmaz ve Ekingen (1987) iki tür sazanda yaptıkları çalışmada lökosit hücre yüzdelerini tespit etmişlerdir. Aynalı Sazan (*C. carpio*)’da, lenfosit %86,7; monosit %0,6; nötrofil %9,8 ve ösinofil %0,8 olarak bulmuşlardır. Pullu sazan (*C. carpio*)’da lenfosit %86,7; monosit %0,9; nötrofil %11,5 ve ösinofil %0,7 olarak bulmuşlardır.

Aly ve ark. (2008) çalışmamız sonuçlarına paralel olarak, Nil Tilapia (*O. niloticus*)’larında 0,25 ppt ekinezya uygulamasının, nötrofil yüzdelerinde bir değişiklik yaratmazken, ösinofil yüzdelerinde önemli fark yarattığını belirlemişlerdir.

Kozinska ve Guz (2004), Sazan (*C. carpio*)’larda *A. bestiarum* aşısı uyguladıkları çalışmalarında nötrofil sayısında 7. günde artış tespit etmişlerdir. Granülosit oluşumlarında özellikle, enfeksiyonun hangi gün ve ne seviyede yoğunlaştığı önemlidir. Çalışmamızda enfeksiyonun 5. günündeki nötrofil sayılarındaki artış istenilen seviyeye ulaşmamasına rağmen; tür farklılığı, yetiştiricilik koşullarının iyi olması ve immünostimülantın uygulama süresine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, yemlere zencefil (*Z. officinale*) ilavesinin *A. hydrophila* ile enfekte olan Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında bazı kan parametrelerine etkisi ve uygulama sonunda balık bireylerinde oluşan savunma gücü ortaya konulmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre, farklı oranlarda zencefil (*Z. officinale*) uygulaması Nil Tilapia (*O. niloticus*)'larında eritrosit, hematokrit, lökosit ve lökosit hücre formüllerini artırmıştır. Çalışma, %0,1; 0,5 ve 1 oranlarında ki zencefil uygulamasının, giderek artan oranlarında hastalığa karşı koruyucu gücün arttığını, hematopoetik ve lenfoid organların uyarıldığını göstermiştir. Ayrıca enjeksiyondan 5 gün sonraya kadar balıklarda ölüm gözlenmemiş ve enfeksiyonun ilk dönemleri olmasına rağmen, savunmaya bağlı olarak lökosit, monosit ve ösinofil hücrelerde artışların başladığı izlenmiştir.

Enfeksiyonun ilk evreleri olmasına rağmen çalışmanın 5. günde sonlandırılıp, balıkların analize alınması ile zencefilli gruplar ile kontrol grubu arasında enfeksiyona bağlı olarak hematolojik farklılıklar tespit edilmiştir. Bu çalışma, söz konusu farklılıkların, güçlü bir immünostimülant olan zencefilin balığın savunmasındaki etkinliğini ortaya koyması açısından önemli bulunmuştur.

İmmünostimülant uygulamaları konusunda daha önce yapılan çalışmalar bize, balık yetiştiriciliğinde immünostimülant kullanımının çok yeni olduğunu ve yapılan son çalışmalar doğrultusunda konunun gelecekte büyük önem taşıyacağını göstermektedir. İmmünostimülantların yem fabrikalarında kullanımı ve yeme ne oranda uygulanması gerektiği ise halen araştırma aşamasındadır.

Tilapia yetiştiriciliğinde hastalık nedeniyle oluşacak kayıpların azaltılması ve bir daha oluşmaması, bilinçsiz antibiyotik tüketiminin önüne geçilmesi ve profilakside doğal ürünlere yer verilmesinde elde edilecek sonuçlardan yararlanılması hedeflenmiştir. Araştırma bulgularının yetiştiricilik işletmelerine, yem sanayine ve balık sağlığı konusunda çalışma yapacak diğer araştırmacılara temel oluşturması ve katkı sağlaması açısından ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- ABD-EL-RAHMAN, A.M.M., 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by Propolis And Its Effect On The Performance Of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology, 27; 454-459.
- ABDEL- TAWWAB, M., ABDEL-RAHMAN, A. M., ISRAEL, N. E. M., 2008. Evaluation of Commercial Live Bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a Growth And Immunity Promoter For Fry Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Challenged in Situ With *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 280: 185-189.
- ABDEL- TAWWAB, M., AHMAD, H.M., SEDEN, M.E., SAKR, S.F.M., 2010. Use of Green Tea, (*Camellia sinensis* L.), in Practical Diet for Growth and Protection of Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus* L.), Against *Aeromonas hydrophila* Infection. Journal of The World Aquaculture Society. Vol.41, No.S2.
- ALDIK, R., CENGİZLER, İ., 2010. Zeolitin *Aeromonas hydrophila* ile Enfekte Edilen Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'ların Bazı Organ ve Dokulardaki Etkilerinin Histopatolojik İncelemeleri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 58s.
- ALİ, H.B., BLUNDEN, G., TANİRA, M.O., NEMMAR, A., 2008. Some Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Properties of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A Review Of Recent Research. Food And Chemical Toxicology, 46. 409-420.
- ALY, S. M., MOHAMMED, F.M., JOHN, G., 2008. Echinacea as Immunostimulatory Agent in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) via Earthen Pond Experiment. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 1033-1041p.
- ANDERSON, D.P, 1992. Immunostimulats, Adjuvants and Vaccine Carriers in Fish: Applications to Aquaculture. Ani. Rev. Fish Dis. 2, 281-307.
- ARDA M., SEÇER, S., SARIEYYÜPOĞLU, M., 2002. Balık Hastalıkları, Medisan Yayın Serisi: 56, Ankara.

- ARDO, L., YİN, G., XU, P., VARADİ, L., SZİGETİ G., JENEY, Z., JENEY, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and Boron Enhance The Non- Specific İmmune Responce Of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Resistance Aganist *Aeromonas hydrophila*. Sciencedirect Aquaculture 275 (2008) 26-33.
- AZİZOĞLU, A., CENGİZLER, İ., 1996. Sağlıklı *Oreochromis niloticus* Bireylerinde Bazı Hematolojik Parametrelerin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- BULDUKLU, P., ÖZER, S., 2007. Mersinde Tüketime Sunulan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Motil Aeromonas'ların Araştırılması ve Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı, E. Ü. Journal of Fisheries&Aquatic Sciences Volume 24, Issue(1-2): 97-102.
- CİPRİANO, R., 2001. *Aeromonas hydrophila* ve Motile Aeromonad Septicemias of Fish. Fish Disease Leaflet, 68.
- ÇAĞIRGAN, H., 1990. Teleostlarda Bağışıklık Sistemi ve Teşhisteki Önemi. Ege Su Ürünleri Dergisi, İzmir,7;57-68s.
- DİKEL, S., 2009. T. C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü Tilapia Yetiştiriciliği. Ankara, 2009; 214-217.
- DOBSİKOVA, R., SVOBODOVA, Z., BLAHOVA, J., MODRA, H., VELİSEK, J., 2006. Stress Response to Long Distance Transportaion of Common Carp (*Cyprinus carpio*). Acta Veterinaria Brno75:437-448.
- DOMÍNGUEZ, M., TAKEMURA, A., TSUCHİYA, M., 2005. Effects of Changes in Environmental Factors on the Non-Spesific Immune Response of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L.. Aquaculture Research, 36; 391-397.
- DÖRÜCÜ, M., İSPİR, Ü., TÜRK, C., 2005. Levamisolün Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Bazı Kan Parametrelerine Etkisinin Araştırılması. F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17(2), 405-411.
- DÖRÜCÜ, M., ÖZESEN ÇOLAK, S., İSPİR, U., ALTINTERİM, B., CELAYİR, Y., 2009. The Effect of Black Cumin Seeds, *Nigella sativa*, on the Immun Response of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Mediterranean Aquaculture Journal, 2(2);1-7.

- DRABKIN, D.L., 1946. Spectrophotometric Studies, XIV. The Crystallographic and Optimal Properties of the Haemoglobin of Man in Comparison With Those of Other Species. J. Biol. Chem., 164:703-723.
- DÜĞENCİ, S., ARDA, N., CANDAN, A., 2003. Some Medical Plants as Immunostimulant for Fish. Journal of Ethnopharmacology; 88 (2003) 99-106.
- EKİNGEN, G., 1988. Balık Hematolojisinin Bilim Uygulamalarındaki Önemi. F.Ü. Veteriner Fak. Derg., Elazığ, (4), 1-5s.
- EROL, H., 2010. SPSS Paket Programı İle İstatistiksel Veri Analizi. Nobel Kitap Evi. 167-210.
- GODA, A.M.A.-S., 2008. Effect of Dietary Ginseng Herb Supplementation on Growth, Feed Utilization, and Hematological Indices of Nile Tilapia (*O. niloticus*), Fingerlings. Journal of World Aquaculture Society, 39:205-214.
- GOPALAKANNAN, A., ARUL, V., 2006. Immunomodulatory Effects of Dietary Intake of Chitin, Chitosan ve Levamisole on Immune System of *Cyprinus carpio* and Control of *Aeromonas hydrophila* Infection in Ponds. Aquaculture, 255; 179-187.
- GÜVELOĞLU, A., 2007. 50 Mucize Bitki. <http://www.herbalistatabay.com/>.
- HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., 2005. Modern Trends in *Aeromonas hydrophila* Disease Management with Fish. Reviews in Fisheries Science; 13: 4, 281-320.
- HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., HEO, M., 2010. Herbal Supplementation Diets on Hematology and Innate Immunity in Goldfish Against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 28(2010) 354- 361.
- HOUSTON, A.H., 1997. Review: Are the Hematological Variables Acceptable Indicators of Fish Health?. Transaction of the American Fisheries Society 126:879-894.
- HRUBEC, T.C., CARDINALE, J. L., SMITH, S. A., 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis* Hybrid). Veterinary Clinical Pathology, 29:7-12.

- KHALLİL, A., MANSOUR, E., 1997. Toxicity of Crude Extracellular Products of *Aeromonas hydrophila* in Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Letters in Applied Microbiology, 25; 269-273.
- KOCABATMAZ, M., EKİNGEN, G., 1987. Comparative Studies on Leukocytes of Some Freshwater Fish Species. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fak. Dergisi, 3:71-81.
- KONU KLUGİL, B., ÖZÇELİKAY, G., 2001. Zencefil'in (*Zingiber officinale*) Tarih Boyunca Önemi ve Günümüzdeki Kullanımı. Ankara Üniversitesi Dergisi, Ankara.263-337.
- KOZİNSKA, A., GUZ, L., 2004. The Effect of Various *Aeromonas bestiarum* Vaccines on Non- Specific Immune Parameters and Protection of Carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish and Shellfish Immunology, 16:437-445.
- LAKSHMİ, B.V.S., SUDHAKAR, M., 2010. Attenuation of Acute and Chronic Restraint Stress-Induced Perturbations in Experimental Animals by *Zingiber officinale* Roscoe. Food and Chemical Toxicology 48;530-535.
- MAQSOOD, S., SAMOON, M.H., SİNGH,P., 2009. Immunomodulatory and Growthpromoting Effect of Dietary Levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlins Against the Challenge of *Aeromonas hydrophila*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 9:111-120.
- MOHAMAD, S., ABASALİ, H., 2010. Effect of Plant Extracts Supplemented Diets on Immunity and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Research Journal of Animal Sciences 4(1):26-34.
- NAKAZAWA, T., OHSAWA, K., 2002. Metabolism of (6)-Gingerol in Rats. Life Sciences, 70: 2165-2175.
- NATT, M.P., HERRİCK, C.A., 1952. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. Poult. Sci., 31:735-738.
- NYA, E., AUSTİN, B.,2009. Use of Dietary Ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an Immunostimulant to Control *Aeromonas hydrophila* Infections in Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Diseases 2009, 32, 971-977.
- NYA, E.J., DAWOOD, Z., AUSTİN, B., 2010. The Garlic Component, Alicin, Prevents Disease Caused by *Aeromonas hydrophila* in Rainbow Trout,

- Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 2010, 33, 293-300.
- PETERS, M., FAİSAL, T., AHMED, L., 1988. Stress Caused by Social Interaction and Its Effect on Susceptibility to *Aeromonas hydrophila* Infection in Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. Diseases of Aquatic Organisms, Published May. 31, vol. 4:8-89,1988.
- RAA, J., 1996. The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. Reviews in Fisheries Science, 4(3), 229-288.
- SAHU, S., DAS, B. K., MİSHRA, B. K., PRADHAN, J., SARANGİ, N.,2007. Effect of *Allium sativum* on the Immunity and Survival of *Labeo rohita* Infected with *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Ichthyol. 23(2007), 80-86.
- SAKAİ, M., 1999. Current Research Status of Fish Immunostimulants. Aquaculture 172;63-92.
- SARDER, R., THOMPSON, K., PENMAN, D., MCANDREW, B., 2000. Immun Responses of Nile Tialpia (*Oreochromis niloticus* L.) Clones: I. Non-Spesific Responses. Developmental and Comperative Immunology, 25; 37-46.
- SARIHAN, F., CENGİZLER, İ., 2005. Tilapia (*Oreochromis niloticus*)’larda Levamisole ve *Streptococcus iniae* Uygulamasından Sonra Oluşan İmmün Yanıtın İzlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 88s.
- STOİLOVA, I., KARASTANOV, A., STOYANOVA, A., DENEV, P., GARGOVA, S., 2007. Antioxidant Activity of Ginger Extract (*Zingiber officinale*). Food Chemistry 102; 764-770.
- SAVAŞ, H., TÜRE, M., 2007. Bölgemizde Doğal ve Kültürü Yapılan Balıklarda Görülen Hastalıklar, SÜMAE Yunus Araştırma Bülteni, 7:2.
- ŞAHAN, A., CENGİZLER, İ., 2002. Seyhan Nehri(Adana Kent İçi Bölgesi)’nde Yaşayan Benekli Siraz (*Coepoeta barroisi* Lortet, 1894) ve Kızıl Göz (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758)’de Bazı Hematolojik Parametrelerin Belirlenmesi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 26: 849-858.
- ŞAHAN, A., DUMAN, S., 2010. Influence of β - 1,3/ 1,6 Glucan Applications on Some Non-Specific Cellular Immune Response and Haematologic Parameters

- of Healty Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L., 1758). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2010; 34(1): 75-81. ©TÜBİTAK.
- ŞENGEZER, E., GÜNGÖR, T., 2008. Esansiyel Yağlar ve Hayvanlar Üzerindeki Etkileri. Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg. 2008, 48(2) 101-110.
- TANYER, G., 1985. Hematoloji ve Laboratuar. Ders Kitabı. Ayyıldız A.Ş. Ankara. 442s.
- TAVARES-DÍAS, M., MATAQUEIRO, M.I., PERECİN, D., 2002. Total Leukocyte Counts in Fishes by Direct or Indirect Methods? Boletim do Institudode Pesca, Sao Paulo, 28(2):155- 161.
- THANİKACHALAM, K., KASİ, M., RATHİNAM, X., 2010. Effect of Garlic Peel on Growth, Haematological Parameters and Disease Resistance Against *Aeromonas hydrophila* in African Catfish (*Clarias gariepinus*) (Bloch) Fingerlings. Asian Pasific Journal of Tropical Medicine, 614-618.
- VELİSEK, J., WLASOW, T., GOMULKA, P., SVOBODOVA, Z., NOVOTNY, L., 2007. Effect of 2-Phenoxyethanol Anaesthesia on Sheatfish (*Silurus glanis*, L.). veterinarni Medicina, 52,(3):103-110.
- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP, W., HOLE, R., 1998. Immunomodulation by Dietary Vitamin C ve Glucan in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish&Shellfish Immunology, 8, 409-424.
- WANG, W. S., WANG, D. H., 1997. Enhancement Of The Resistance Of Tilapia And Grass Carp To Experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* Infections by Several Polysaccharides. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., Vol. 20, No. 3; 261-270.
- YARDIMCI, B., AYDIN, Y., 2011. Pathological Findings of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ankara Üni. Vet. Fak. Derg, 58, 47-54.

ÖZGEÇMİŞ

23.04.1983 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamlayıp, 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2008 yılında mezun oldu ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma görevliliği sınavını kazandı. Halen Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.