

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**Antimikrobiyel Madde Uygulamalarının Gökkuşığı Alabalıklarında
(*Oncorhynchus mykiss*) Non-Spesifik Bağışık Yanıt Etkilerinin Değerlendirilmesi**

Proje Yürütücüsü: Doç.Dr.Hijran YAVUZCAN

BAP Hızlandırılmış Proje

02/05/2005

24/04/2006

Ara Rapor :28/11/2005

Ankara Üniversitesi

Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara"2006"

I. Antimikrobiyel Madde Uygulamalarının Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Non-Spesifik Bağışık Yanıt Etkilerinin Değerlendirilmesi

Özet

Türkiye’de yetiştiricilik yoluyla elde edilen su ürünleri üretimi sürekli bir gelişim göstermesine rağmen sektör, gelişimin sürdürülebilirliğini etkileyen hastalık problemleri ile karşı karşıyadır. Üretim artışına paralel olarak hastalık problemleri de oransal olarak artış göstermektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık problemlerinin çözümünde daima profilaktik tedbirler daha fazla önem taşımaktadır. Bu nedenle enfeksiyonların engellenmesi amacıyla çeşitli antimikrobiyel maddeler eksternal olarak uygulanmaktadır. Hem deniz balıkları hem tatlısu balıkları yetiştiriciliğinde formalin, malaşit yeşili, Leteux-Meyer karışımı ve Chloramin-T gibi dezenfektan antimikrobiyel uygulamalarının profilakside büyük bir yeri vardır. Ancak dezenfektan olarak kullanılan bu maddelerin stres fizyolojisine ve bağışıklığa etkileri tam olarak bilinmemektedir. Dezenfektan uygulaması herhangi tanımlanmamış -gizli- bir stres kaynağı olabilmektedir. Çevresel stres ile hastalıkların ortaya çıkışının birlikte olması, stresörün immun sistemi baskılamasıyla bağlantılı olabilmektedir (Iwama and Nakanishi, 1996). Balıklarda stres yanıtı, kan glukoz seviyesi, hematokrit ve elektrolit dengesi gibi parametrelerin ölçülmesiyle izlenebilmektedir. Balığın non-spesifik bağışık yanıtı enfeksiyonlara karşı dirençte son derece önemlidir ve lizozim, C-reaktif protein, seruloplazmin gibi parametrelerle ölçülebilmektedir. Refah, stres ve balık sağlığı arasında bir ilişki vardır ve bu ilişki çok karmaşıktır. Stres yanıtı ve immun fonksiyon gibi sağlık indikatörleri ‘refah’ olgusunun belirli bir yansımasıdır (Sneddon 2006). Bu proje kapsamında intensif alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliğinde en fazla kullanılan antimikrobiyel maddelerden Malaşit yeşili, Formalin, Chloramin-T ve Leteux-Meyer karışımının alabalıklardaki stres yanıtı ve non-spesifik immun yanıt parametrelerinden hematokrit, lökokrit, hemoglobin miktarı, plazma glukoz seviyesi, albumin, ceruloplasmin, total protein, total immunoglobulin, total demir, plazma lizozim aktivitesi, serum bakterisidal aktivitesi üzerine etkisi saptanmıştır. Belirtilen antimikrobiyel maddelerin konsantrasyonları ve uygulama süreleri, yetiştiricilik ortamındaki gerçek uygulamalar dikkate alınarak belirlenmiştir.

Proje, profilaktik olarak kullanılan antimikrobiyellerin balık refahını etkileyerek canlı üzerinde stres yaratıp yaratmadığı, non-spesifik bağışık yanıtı baskılayıp baskılamadığı ve balıkları hastalıklara açık hale getirip getirmediğinin saptanmasına olanak sağlamıştır. Bu bağlamda, Gökkuşığı alabalıklarının bu çalışmada denenen antimikrobiyel maddelere, (formalin, malaşit yeşili, Leteux-Meyer karışımı ve Chloramin-T) uygulanan konsantrasyon ve süreler dahilinde olmak üzere karşı hafif düzeyde, 'geçici' bir stres yarattığı sonucuna varılmıştır. Antimikrobiyel uygulamalarının ardından 24 saatlik bir süre normale dönüş için yeterli bulunmuştur. İncelenen non-spesifik bağışık yanıt parametrelerinin belirtilen konsantrasyon ve sürelerde antimikrobiyel madde uygulamalarından aşırı düzeyde etkilenmediği ve dolayısıyla non-spesifik sistemin baskılanmadığı sonucuna varılmıştır.

Evaluating the Effects of Antimicrobial Agents Application on the Non-Specific Immune Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Abstract

Although a rapid development of aquaculture has been well recognized in Turkey, aquaculture sector faces problems with diseases which can affect its sustainability. With increasing intensification of aquaculture, incidence of diseases is also increasing proportionally. In aquaculture the prophylactic measures are more important in the solution of disease problems. A variety of external antimicrobial agents are used for the prevention of infections. In aquaculture both in marine and freshwater, use of formalin, malachite green, Leteux-Meyer mixture and Chloramin-T has a great place. However, the effects of antimicrobial agents used as disinfectant on the stress physiology and immune system are not well known. The treatment with disinfectant may be a source of underrecognized stress. An association between environmental stressors and outbreak of disease in fish, is probably linked to the immunosuppressive actions of stressors. Stress response of fish can be estimated by monitoring the parameters such as blood glucose level, hematocrit and electrolyte balance. Non-specific immune response of fish is extremely important against infections and could be measured the parameters such as lysozyme, C-reactive protein and ceruloplasmin. The relationship between welfare, stress and the health of fish is complex. Health indicators such as immune function and

stress response are a reflection of welfare. In this Project the aim was to the evaluation of the effects of formalin, malachite green, Leteux-Meyer mixture and Chloramin-T used as an external antimicrobial agents on the stress physiology and non-specific immune response of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) cultured intensively. The concentrations and the exposure time of the mentioned antimicrobial agents were selected considering the practical and reel application in aquaculture. Stress and non-specific response were monitored by measuring the hematocrit, leucocrit, hemoglobin levels, plasma glucose, albumin, ceruloplasmin, total protein, total immunoglobulin, total iron, plasma lysozyme activity, serum bactericidal activity in blood plasma. By means of this project, it was highlighted that the use of prophylactic antimicrobial agents whether create an underrecognized stress or not, whether suppress the non-specific immune response or not and whether predispose the fish to diseases or not.

Hence, antimicrobial agents in this study (formalin, malachite green, Leteux-Meyer mixture and Chloramin-T) applied in a specified concentration and duration lead to slight and transient stress response. After exposure of antimicrobials 24 h was found to be enough for the recovery of fish. Tested non-specific parameters were not excessively affected by the treatment of antimicrobials and finally, exposure of fish to antimicrobials for selected concentrations and period did not cause the suppression of the non-specific immune response.

II. Amaç ve Kapsam

Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya besin gereksiniminin önemli kısmını karşılayan bir endüstridir ve FAO tarafından dünyada en hızlı büyüyen sektör olarak belirlenmiştir. Türkiye’de 2002 yılında yetiştiricilikle elde edilen su ürünleri 61600 tondur ve Avrupa Birliğine dahil ülkeler içinde 7. sıradadır. Türkiye, özellikle çipura ve levrek üretiminde çok hızlı bir gelişme göstererek Akdeniz ülkeleri içinde 2. sırayı almıştır (Anonim 2003). Türkiye’de en çok yetiştiriciliği yapılan tatlısu balığı, gökkuşağı alabalığıdır (*Onchorynchus mykiss*). 2003 yılı verilerine göre alabalık üretimimiz 35000 tonun üzerindedir (Anonim 2003) ve Türkiye’de 1215 adet alabalık işletmesi bulunmaktadır (Aydın et al. 2005). Ayrıca son yapılan düzenlemelere göre baraj göllerinin yüzey

alanının % 1'i kafes balıkçılığına ayrılmıştır ve 2004 yılında baraj göllerinde 4774 ton/yıl kapasiteli 72 tesis olduğu bildirilmiştir (Aydın et al. 2005).

Yetiştiricilikle sağlanan üretimde, gerek ülke bazında gerekse bir çiftlik bazında ortaya çıkan dalgalanmalar birkaç nedene bağlı olmakla birlikte esasen hastalıklara bağlıdır. İntensif ve yarı-intensif su ürünleri yetiştiriciliğinin gelişiminin bir sonucu olarak ortaya çıkan hastalık problemleri, sektör gelişiminin sürekliliğini engelleyen en önemli faktörler arasındadır. Bu durum, özellikle ulusal ekonomisinde ciddi riskler oluşabilecek gelişmekte olan ülkeler için sorunlar yaratır.

Balık yetiştiriciliğinde karşılaşılan ve ürün kalitesini düşüren, maliyeti arttıran ve hatta çoğu kez toplu balık ölümlerine neden olan balık hastalıklarının incelenmesi ve tedavisi her geçen gün biraz daha önem kazanmaktadır. Balık hastalıklarına hem doğal ortamlarda hem de yetiştiricilik sırasında rastlanabilir. Birçok hastalık etmeni doğal ortamlarda sürekli olarak bulunur, ancak yoğunlukları nadiren tehlikeli boyutlara ulaşır ve dolayısıyla problem yaratmazlar. Yetiştiricilikte amaç ticari bir başarı elde etmek olduğu için balıklar doğal ortamdakinden daha yüksek yoğunlukta stoklanır ve bu da hastalıkların gelişmesine ve hızlı bir şekilde yayılmasına yol açar. Bu nedenle yetiştiricilikte karşılaşılan hastalıklar ayrı bir önem teşkil eder. Balık hastalıklarının tedavi edilerek çözümü genellikle çok zordur. Bu bağlamda balık yetiştiriciliğinde her zaman profilaktik tedbirler ön plana çıkmaktadır. Profilaksi kapsamında yetiştiricilikte önemli olan dezenfeksiyondur. Ancak dezenfeksiyon amacıyla kullanılan kimyasalların beklenen olumlu etkilerinin yanısıra bazı olumsuz etkileri de olabilmektedir. Balığın herhangi bir kimyasala maruz bırakılması, o kimyasalın spesifik etkileri göz ardı edildiğinde bile balık için bir stres etkenidir. Stresin ise balıklarda immün sistemi baskıladığı ve balığı hastalıklara karşı daha duyarlı hale getirdiği ve balığın büyümesini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Yavuzcan and Pulatsü 1999; Endo et al., 2002).

Diğer omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da bağışıklık sistemi, spesifik bağışıklık ve spesifik olmayan bağışıklık olmak üzere iki kısma ayrılır. Memelilerle kıyaslandığında balıkların temel savunma mekanizması spesifik olmayan sisteme dayanır. Bu açıdan bakıldığında balıklar yetersiz bir savunmaya sahipmiş gibi görünebilir. Ancak spesifik olmayan sistemin bazı avantajları vardır; yabancı (antijen, bakteri, virus vs) tanınması olayına gerek yoktur; çok kısa sürede cevap verilir ve nispeten sıcaklıktan bağımsız çalışır (Ellis, 2001).

Tedavi veya profilaktik amaçla uygulanan kimyasallara karşı balığın toleransı türe ve uygulama şekline göre değişmektedir (Hoffman and Meyer, 1974). Bu nedenle, epizootikleri önleme amacı ile herhangi bir kimyasal uygulamadan önce o kimyasalın balık üzerindeki toksisitesi ve balığın bu kimyasala olan toleransı belirlenmelidir. Zira tedavi için önerilen dozlar genellikle lethal dozlara çok yakındır. Balığın genel sağlık durumunun ve bu kimyasallara olan toleransının izlenmesi için en iyi yöntemin kan parametrelerinin incelenmesi olduğu vurgulanmaktadır (Fajer-Avilla et al. 2003). Bu çalışmada hematokrit, lökokrit, hemoglobin, plazma glukoz, albumin, ceruloplasmin, total plazma proteini, total demir, plazma lizozim aktivitesi ve serum bakterisidal aktivitesi incelenmiştir. Bu parameterlerden hematokrit ve hemoglobin miktarı basit olarak, dokuların oksijen gereksinimi belirlemek, lökokrit ise balığın immün durumu hakkında genel bir fikir edinmek için kullanılmaktadır (Blaxhall and Daisley, 1973; McLeay and Gordon, 1977). Total protein ve albumin seviyesi ise balığın metabolizması hakkında genel bir fikir edinmek için kullanılmaktadır (örneğin, stres koşulları altında katabolizmanın arttığı ve albumin ve total protein seviyesinin azaldığı bilinmektedir). Kan glukozu, stresi sekonder seviyede ölçebilmeyi sağlayan en pratik parametrelerden birisidir (Hatting, 1976; Smith 1991). Diğer parametreler ise balığın immün sisteminin bir bileşeni olup balığın bu kimyasala olan toleransının ve sekonder stres yanıtının yorumlanması açısından önemlidir.

Formalin başta *Costia* ve diğer protozoonlar ve monogenetik trematodlar olmak üzere, deri ve solungaçların ektoparazitik enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır. Ayrıca su ürünleri yetiştiriciliğinde rastlanan *Saprolegnia* gibi mantar enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Ancak formalin başta solungaç epitellerinde irritant etki gösterir ve suda çözülmüş oksijen miktarını düşürür.

Chloramin-T ise daha çok bakteriyel ve ektoparazitik enfeksiyonlar için kullanılmaktadır (Bullock et al. 1991) ve özellikle tekrarlı uygulamaların alabalıkların büyüme oranı üzerinde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (Powell et al., 1994; Sanchez et al., 1996). Chloramin-T hem tedavi amaçlı hem de profilaktik amaçlı olarak kullanılmaktadır. Chloramin-T suda hipoklorik aside dönüşür ve bu reaksiyon sonrasında oksijen ve chlorin açığa çıkar. Hipoklorit ve mono- ve dikloraminlerin balıklar üzerinde toksik etkileri olduğu belirtilmiştir (Stober et al., 1980). Bu toksik

etkilerin en belirgin olanı akut solunum problemleri olarak kendini göstermektedir (Powell et al., 1998).

Malaşit yeşili ise bazı Avrupa ülkelerinde toksisitesi yüzünden tamamen yasaklanmış olmasına rağmen hala *Saprolegnia* gibi mantar enfeksiyonlarında özellikle yumurtalar için kullanılan en etkili kimyasaldır. Ayrıca çeşitli protozoonal hastalıklarda da kullanılmaktadır. Malaşit yeşilinin pek çok çalışmada akut ve kronik uygulamalarının balıklar üzerinde toksik etkileri olduğu özellikle kan parametrelerinde sapmalara yol açtığı gösterilmiştir (Srivastava et al. 1995a,b; Svobodova et al. 1997; Yavuzcan and Pulatsü, 1999).

Leteux-Meyer ise malaşit yeşilinin etkinliğini arttırmak için formaldehitle belirli oranlarda karıştırılması ile elde edilen bir karışımdır. *Ichthyophthirius*, *Costia* ve *Trichodina* gibi protozoonlara karşı etkindir (Leteux and Meyer, 1972).

Bu çalışmada, balık yetiştiriciliği profilaksisinde sıklıkla antimikrobiyel madde olarak kullanılan Formalin, Chloramine-T, Malaşit yeşili ve Leteux-Meyer karışımının (LMM) eksternal uygulamalarda gökkuşağı alabalıklarının non-spesifik bağışık yanıtına ve stres indikatörü kan parametrelerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında söz konusu antimikrobiyel maddelerin uygulanmasını takiben hematokrit, lökokrit, hemoglobin miktarı, plazma glukoz seviyesi, albumin, ceruloplasmin, total protein, total immunoglobulin, total demir, plazma lizozim aktivitesi, serum bakterisidal aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ile antimikrobiyel madde uygulamasının balıklarda bir stres kaynağı olup olmadığının ve non-spesifik sistem üzerinde bir baskı oluşturup oluşturmadığının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

III. Materyal ve Yöntemler

3.1. Balık materyali ve deneme planı

Çalışmada öncelikle analizlerin tam olarak yapılabilmesi için bir ön deneme yapılmıştır. Bu ön deney için Kesikköprü Baraj Gölündeki ticari bir alabalık tesisinden getirilen 150-200 g arası balıklar kullanılmıştır. Ön deneme, Anakara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümündeki bir akvaryum ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Ancak alabalıkların fizyolojik gereksinimlerini, özellikle oksijeni yüksek, soğuk su temini bakımından Bölüm koşullarının sağlıklı olmadığı görülmüştür. Nitekim

balıklarda söz edilen koşullardan dolayı fazla sayıda ölüm meydana gelmiştir. Bulguları olumsuz etkileyebilecek bu koşulları elimine etmek üzere çalışma gerçek optimal koşulları sağlamak üzere Kastamonu'da bulunan ticari bir alabalık işletmesinde yapılmıştır. Analizler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Balık Hastalıkları Laboratuvarında yürütülmüştür. Denemenin gerçekleştirilmesinde 400 balık (100-150 g) kullanılmıştır. Denemede kullanılan antimikrobiyel maddelerin kullanım doz ve süreleri Treves-Brown'a (2000) göre belirlenmiştir. Deneme planı Çizelge 3.1.de verilmiştir. Örneklemede iki aşama bulunmaktadır: 1. Antimikrobiyel maddeye maruz bıraktıktan hemen sonra örnekleme 2. Antimikrobiyel maddeye maruz bıraktıktan sonra 24 saat temiz suda beklettikten sonra örnekleme (iyileşme periyodu).

Çizelge 3.1. Deneme planı

Antimikrobiyal Madde	Doz	Süre	Örnekleme Periyotları	
Formalin	250 ppm	30 dak	Uygulamayı takiben ilk 10 dakika içinde	Uygulamadan 24 saat sonra (iyileşme periyodu)
Chloramin-T	5 ppm	3 saat	Uygulamayı takiben ilk 10 dakika içinde	Uygulamadan 24 saat sonra (iyileşme periyodu)
Malaşit Yeşili	1.6 ppm	40 dak	Uygulamayı takiben ilk 10 dakika içinde	Uygulamadan 24 saat sonra (iyileşme periyodu)
Leteux-Meyer karışımı	25 ppm	30 dak	Uygulamayı takiben ilk 10 dakika içinde	Uygulamadan 24 saat sonra (iyileşme periyodu)

3.2. Analitik işlemler

Plazma/serum eldesi

Kan, içi önceden heparinlenmiş 10 ml'lik enjektör ile kaudal venadan alınmıştır. Daha sonra kılcal hematokrit tüplerine transfer edilen kan 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant ayrılarak (tüplerin kırılmasıyla) analizlere kadar -20°C'de saklanmıştır.

Serum elde etmek için yine kaudal venadan heparinsiz enjektörlerle kan alınmıştır ve heparinize olmayan hematokrit tüplerine transfer edildikten sonra 12.000 rpm'de 5

dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant ayrılarak analizlere kadar -20°C’de saklanmıştır.

Hematokrit/lökokrit ölçümü

Hematokrit (Hct) ve Lökokrit (Lct) ölçümü için mikrokapiller tüplere transfer edilen kan mikrohematokrit santrifüjde 12.000 rpm’de 4 dakika santrifüj edilmiş ve hematokrit değerleri ölçülmüştür (Siwicki and Anderson 1993). Lökokrit ölçümü mikrometrik oküler takılmış ışık mikroskobunda yapılmıştır (McLeay ve Gordon, 1977).

Hemoglobin analizi

Enjektöre alınan kanın bir kısmı (20 µl) Hb tayini için özel hemoglobin tüplerine alınmış ve üzerine 5 ml Drabkin solusyonu eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu karışımdan 2 ml alınarak spektrofotometrede 540 nm’de Drabkin solusyonuna karşı okunmuştur (Stoskopf 1993).

Plazma glukoz analizi

Glukoz miktarının tayini için o-toluidine yöntemi kullanılmıştır (Feteris, 1965; Frings et al. 1970). Glukoz tayini için 10 ml o-toluidine çalışma solusyonunun üzerine 1 ml serum eklenmiş ve tüplerin ağzı parafilmle kapatıldıktan sonra kaynayan su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra buz banyosuna alınan tüpler 2-3 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede kör ve standarta karşı 630 nm’de okunmuştur.

Albumin analizi

Albumin seviyesinin belirlenmesi için 2 ml BCG (Bromocresol green) çalışma solusyonunun üzerine 3 ml distile su ve 10 µl serum eklenmiştir (Rodkey, 1965; Westgard and Poquette, 1972). Bu karışım spektro küvetlerine alınarak 5 dakika bekledikten sonra spektrofotometrede kör ve standarta karşı 628 nm’de okunmuştur. Standart olarak BSA (bovine serum albumin kullanılmıştır). Aşağıda BCG çalışma solusyonu ve standart BSA hazırlanışı verilmiştir.

BCG çalışma solusyonu

0.0262 g BCG (Bromocresol Green)

0.0244 g NaN₃

2.2140 g succinic acid

200 ml distile su

İyice karıştırıldıktan sonra üzerine 1 damla Triton X-100 eklenir. Daha sonra 1 N NaOH veya Succinic asit kullanılarak pH 4.15-4.25 arasına ayarlanır. Çözelti 250 ml lik balon jojeye alındıktan sonra distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

Standart BSA (Bovine serum albumin)

6.0 g BSA

50 mg NaN_3 tartılarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Ceruloplasmin analizi

Ceruloplasmin (Cp) seviyesi *p*-fenilendiamine (PPD) oksidaz aktivitesine dayanan spektrofotometrik yöntemle (Siwicki and Anderson 1993; Pelgrom et al., 1995) ölçülmüştür. Önceden hazırlanmış olan asetat tamponundan (pH= 5.45) 2 ml alınır ve üzerine 0.1 ml serum eklenir. Daha sonra bunun üzerine önceden su banyosunda 20-25°C'ye getirilmiş PPD solusyonundan 1 ml eklenir. Karanlıkta 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 30 dakika sonunda üzerine 50 μl 1,5 M'lık sodyum azide (NaN_3) solusyonu eklenir ve 530 nm de absorbans okunur. Aşağıda ceruloplasmin seviyesinin tespiti için kullanılan formül ve PPD solusyonunun hazırlanışı verilmiştir.

Cp (mg/ml): $75.2 (\text{Absorbans bilinmeyen} - \text{Absorbans kör})$

PPD solusyonu

0.5 g PPD

75 ml asetat tamponu (pH= 5.45) ile karıştırılır ve üzerine 1 M'lık NaOH damlatılarak pH tekrar 5.45'e ayarlanır. Son hacim 100 ml olacak şekilde distile su eklenir.

Toplam protein analizi

Total protein miktarı, biüret yöntemine göre ölçülmüştür (Siwicki and Anderson 1993). Buna göre plazmanın 0.1 ml'sine Gornall ayracı eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Inkubasyon süresinin sonunda 540 nm dalga boyunda Gornall'a karşı okunmuştur.

Gornall ayracı

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g

$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 6.0 g

500 ml distile su

NaOH 300 ml

Toplam 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Total plazma immunoglobulin ölçümü

Total plazma Immunoglobulin (Ig) seviyesi için Siwicki and Anderson'un (1993) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 0.1 ml plasmanın üzerine, 0.1 ml polietilen glikol (PEG 10.000, %12 lik, PBS içinde) eklenmiş ve bu karışım çalkalayıcıda 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen ve süpernatanttaki protein miktarı Biüret yöntemine göre ölçülmüştür. Total plazma proteini ile bu süpernatantdaki protein miktarı arasındaki fark total plazma Ig seviyesi olarak hesaplanmıştır.

Toplam demir analizi

Total demir (Fe) miktarının tayini için Caraway (1963)'ın önerdiği yöntem kullanılmıştır. 100 µl serum, 50 µl askorbik asit solusyonu ile karıştırılır ve 5 dak beklenir. Bunun üzerine 50 µl % 20 lik TCA eklenir. 5 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra vortexle karıştırılır ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenir. Daha sonra elde edilen süpernatanttan 100 µl alınarak üzerine 10 µl TPTZ ve 10 µl amonyum asetat eklenir. Bu karışım spektrofotometrede kör ve standarta karşı 590 nm'de okunur. Aşağıda gereken solusyonların hazırlanışı verilmiştir.

Askorbik asit: %1 lik, 0.2 N HCl içinde hazırlanır.

TCA: % 20 w/v

Amonyum asetat: % 40 w/v

TPTZ (% 0.1): 0.1 g TPTZ tartılır ve üzerine 2 ml glasiyel asetik asit eklenir. Daha sonra double distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Standart Fe : 20 mg/ 100 ml

Plazma lizozim aktivitesinin ölçümü

Lizozim aktivitesi için Sarder et al. (2001) in önerdiği şekilde spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. 100 µl plazma 1900 µl *Micrococcus lysodeikticus* süspansiyonu (0.2 mg/mL, 0.05M H₂PO₄ içinde) ile karıştırılmış ve 30. saniye sonunda ve 4.5. dakika

sonunda olmak üzere 530 nm’de toplam iki okuma yapılmıştır. Lizozim aktivitesi (U), absorbandsdaki 0.001 birim (U)/dakika değişim olarak hesaplanmıştır.

NBT analizi

NBT Assay: Anderson et al. (1992)’in önerdiği mikroskopta sayım esasına dayanan yönteme göre yapılmıştır. Yaklaşık 0.05 ml kan lamele damlatılmış daha sonra içinde ıslak havlu kağıt bulunan steril petri kutularına alınmıştır. Burada 30 dakika inkubasyona bırakılmıştır Bu aşamada aktive nötrofil ve monositlerin cama yapışması beklenmektedir. Sonra pastör pipeti yardımıyla PBS ile hafifçe yıkanmış ve üzerine %0.2’lik NBT ilave edilecek tekrar 30 dakika inkube edilmiştir. Mikroskopta mavi boyanan yapışmış hücreler sayılmıştır. Ancak hiçbir zaman mavi boyanma karakteristik olarak görülememiş olduğundan anlamlı sonuçlara ulaşılamamıştır.

Fagositik indeks

Fagositik indeks, Sahoo and Mukherjee (2003)’nin önerdiği mikroskobik yönteme göre tayin edilmiş ancak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Yöntem farklı sıcaklık ve sürelerde tekrarlanmasına rağmen, anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır. Ayrıca yöntemde *Aeromonas salmonicida* yerine *Bacillus subtilis*’de denenmiş ancak yine de başarıya ulaşmamıştır.

Serum bakterisidal aktivitesi

Serum bakterisidal aktivitesi Sahoo and Mukherjee (2003)’nin önerdiği ve koloni sayımı esasına dayanan yönteme göre tayin edilmiştir. Bakteri kültürü olarak *Aeromonas hydrophyla* kullanılmıştır. Sıvı besiyerine ekilen bakteri kültürü 3000 g de 15 dakika santrifüjlendikten sonra 3 kez önceden sterilize edilmiş PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra bu bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak 900 µl serum ile karıştırılmış ve 25 °C de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bu karışım TSA (Tryptic Soy Agar) üzerine yayma ekim yapılmıştır. Bir gün sonra koloni sayımı yapılmıştır.

Serum bakterisidal aktivitesinin hesaplanması için her deneme grubundan 5’er adet balığa ait serum örnekleri birleştirilmiş ve bu şekilde ekim yapılmıştır. Yöntem iki kez tekrarlanmış ve bu iki deneye ait ortalama alınarak serum bakterisidal aktivitesi hesaplanmıştır.

İstatistiki değerlendirme

Elde edilen sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesinde; deneme gruplarının kontrole göre farklılığının bulunmasında ANOVA, farklılık bulunan parametrelerde de Tukey testi kullanılmıştır.

IV. Analiz ve Bulgular

Malaşit yeşili uygulaması

Malaşit yeşili uygulamasının (1.6 ppm, 40 dakika) hematokrit, lökokrit, hemoglobin, plazma glukoz, albumin, ceruloplazmin, toplam protein, toplam immunoglobulin, toplam demir ve plazma lizozime olan etkileri ile aynı parametrelerin iyileşme periyodundaki değerleri Çizelge 4.1.de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Malaşit yeşili uygulaması ile iyileşme periyodu sonrasında bazı stres ve bağışık yanıt parametrelerinin değişimi

	Uygulama (Ortalama±SD)	İyileşme (Ortalama±SD)	Kontrol (Ortalama±SD)	Kontrol iyileşme (Ortalama±SD)	ANOVA P<0.05
Hematokrit (%)	35,41±5,96 A	34,78±2,03 A	25,96±5,00 B	26,92±1,27 B	0,001 *
Lökosit (%)	1,54±0,72A	0,79±0,03BC	1,07±0,50B	1,62±0,58A	0,03 *
Hemoglobin (g/dL)	10,36±2,14	10,47±1,01	7,92±1,86	8,20±0,79	0,42
Plazma glukoz (mg/dL)	83,16±46,10 A	64,51±8,91 AB	44,9±8,85 B	38,75±4,38 B	0,001 *
Albumin (g/dL)	2,52±0,29	2,57±0,41	2,42±0,49	2,49±0,60	0,57
Ceruloplasmin (mg/dL)	12,02±5,85	8,77±4,86	17,96±12,32	19,83±11,00	0,77
Total plazma proteini (g/dL)	7,60±0,87	7,62±1,33	6,95±0,77	6,72±1,00	0,36
Total Ig (g/dL)	2,52±1,23	2,82±0,72	3,45±1,61	2,97±1,92	0,12
Total Fe (µmol/L)	38,90±15,38B	58,90±4,36A	34,56±16,04B	33,22±13,37B	0,04*
Plazma lizozim (X10 ³ U/dk)	0,26±0,010	0,13±0,004	0,183±0,0135	0,163±0,0105	0,42

Gökkuşığı alabalıklarına belirtilen dozlarda malaşit yeşili uygulaması incelenen parametrelerden hematokrit, lökokrit, plazma glukoz ve toplam demir üzerinde etkili olmuştur (P<0.05). Plazma glukoz seviyesi, uygulama sırasında önemli düzeyde artmış ancak daha sonra iyileşme periyodunda kontrol değerlerine dönmüştür. Uygulama sırasında yükselen Hct değerleri iyileşme periyodunda kontrol değerlerine dönmemiştir. Lökosit değerleri uygulama sonrası artmış, iyileşme periyodunda azalmıştır ancak, iyileşme grubunun paralel kontrolünde lökokrit değerleri beklenmedik şekilde yüksek

bulunmuştur. Toplam demir, iyileşme periyodunda kontrollere göre yüksek bulunmuştur.

Formalin uygulaması

Formalin uygulamasının (250 ppm, 30 dakika) hematokrit, lökokrit, hemoglobin, plazma glukoz, albumin, ceruloplasmin, toplam protein, toplam immunoglobulin, toplam demir ve plazma lizozime olan etkileri ile aynı parametrelerin iyileşme periyodundaki değerleri Çizelge 4.2.de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Formalin uygulaması ile iyileşme periyodu sonrasında bazı stres ve bağışık yanıt parametrelerinin değişimi.

	Uygulama (Ortalama±SD)	İyileşme (Ortalama±SD)	Kontrol (Ortalama±SD)	Kontrol iyileşme (Ortalama±SD)	ANOVA P<0.05
Hematokrit (%)	31,26±5,15	26,56±3,17	28,68±3,73	27,67±5,23	0,26
Lökosit (%)	1,76±0,20 A	1,30±0,44 AB	0,80±0,02 B	1,24±0,46 AB	0,002 *
Hemoglobin (g/dL)	9,45±1,91	8,09±1,34	8,71±1,51	8,42±1,93	0,53
Plazma glukoz (mg/dL)	79,9±20,97 A	98,9±8,94 A	42,67±10,62 B	40,22±6,31 B	0,001 *
Albumin (g/dL)	1,56±0,51 A	1,75±0,35 AB	2,31±0,29 B	2,06±0,26 AB	0,04 *
Ceruloplasmin (mg/dL)	8,5±3,81	11,6±8,62	8,23±4,53	8,66±3,78	0,79
Total plazma proteini (g/dL)	4,5±0,41 A	6,39±0,37 B	7,42±0,47 B	6,72±1,01 B	0,001 *
Total Ig (g/dL)	0,39±0,04C	1,61±0,75B	2,94±0,98A	2,50±1,86A	0,013*
Total Fe (µmol/L)	111,53±23,9	95,51±78,3	40,55±17,32	34,68±24,14	0,15
Plazma lizozim (X10 ³ U/dk)	0,87±0,006	0,21±0,019	0,18±0,012	0,19±0,016	0,73

Formalin uygulaması, gökkuşağı alabalıklarının Lct, plazma glukoz, albumin, toplam Ig ve toplam protein değerlerinde istatistiki olarak önemli değişimlere yol açmıştır (P<0.05). Lökosit değerleri, formalin uygulaması sırasında yükselerek iyileşme periyodunda hafif azalsa da kontrol değerlerine dönmemiştir. Plazma glukoz değerleri, uygulama ve iyileşme periyodunda kontrole göre yüksek bulunmuştur. Toplam protein değerleri uygulama sonrasında alınan örneklerde yüksek bulunmuştur. Albumin değerleri, uygulama gruplarında kontrole göre düşük bulunmuştur. Toplam Ig değerleri

formalin uygulamasında düşmüştür. İyileşme periyodunda yükselmiş olsa da kontrol değerlerine ulaşamamıştır.

Leteux-Meyer Karışımı (LMM) uygulaması

LMM uygulamasının (25 ppm, 30 dakika) hematokrit, lökosit, hemoglobin, plazma glukoz, albumin, ceruloplasmin, toplam protein, toplam immunoglobulin, toplam demir ve plazma lizozime olan etkileri ile aynı parametrelerin iyileşme periyodundaki değerleri Çizelge 4.3.de verilmiştir.

Çizelge 4.3. LMM uygulaması ile iyileşme periyodu sonrasında bazı stres ve bağışık yanıt parametrelerinin değişimi.

	Uygulama (Ortalama±SD)	İyileşme (Ortalama±SD)	Kontrol (Ortalama±SD)	Kontrol iyileşme (Ortalama±SD)	ANOVA P<0.05
Hematokrit (%)	26,05±2,58 A	32,70±2,70A B	28,40±3,18 A	26,69±1,12 AB	0,06
Lökosit (%)	1,03±0,28	0,85±0,31	0,93±0,32	0,75±0,26	0,46
Hemoglobin (g/dL)	7,95±1,70	9,87±1,20	8,63±1,34	8,13±0,74	0,26
Plazma glukoz (mg/dL)	73,38±31,26A	72,52±9,16A	48,07±9,10B	39,7±7,63B	0,01*
Albumin (g/dL)	1,76±0,50	2,01±0,54	2,18±0,31	2,27±0,49	0,35
Ceruloplasmin (mg/dL)	15,82±8,57	15,60±7,75	7,25±4,19	8,66±3,78	0,43
Total plazma proteini (g/dL)	6,15±1,37	4,88±0,48	6,43±0,72	6,64±0,95	0,07
Total Ig (g/dL)	3,33±1,20 B	2,71±0,45 B	3,79±0,75 A	4,19±1,05 A	0,01 *
Total Fe (µmol/L)	15,61±7,88	19,32±7,62	34,56±16,04	24,13±19,89	0,35
Plazma lizozim (X10 ³ U/dk)	0,231±0,0148	0,108±0,0078	0,236±0,0168	0,163±0,0128	0,50

LMM uygulaması incelenen parametrelerden plazma glukoz ve toplam immunoglobulin seviyesi üzerinde istatistiki olarak önemli bir değişim yaratmıştır (P<0.05). Hematokrit değerleri iyileşme periyodunda, elde edilen diğer değerlere göre önemli bir artış göstermiştir. Uygulama sırasında artış gösteren plazma glukoz değerleri, iyileşme periyodunda da kontrol değerlerine inmemiştir. Uygulama gruplarındaki toplam immunoglobulin seviyesi kontrole göre yüksek bulunmuştur. LMM uygulamasında

toplam demir değerleri gruplar arasında önemli bir farklılık gösteriyormuş gibi gözükse de bu farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$).

Chloramin-T uygulaması

Chloramin-T uygulamasının (5 ppm, 3 saat) hematokrit, lökokrit, hemoglobin, plazma glukoz, albumin, ceruloplazmin, toplam protein, toplam immunoglobulin, toplam demir ve plazma lizozime olan etkileri ile aynı parametrelerin iyileşme periyodundaki değerleri Çizelge 4.4. de verilmiştir.

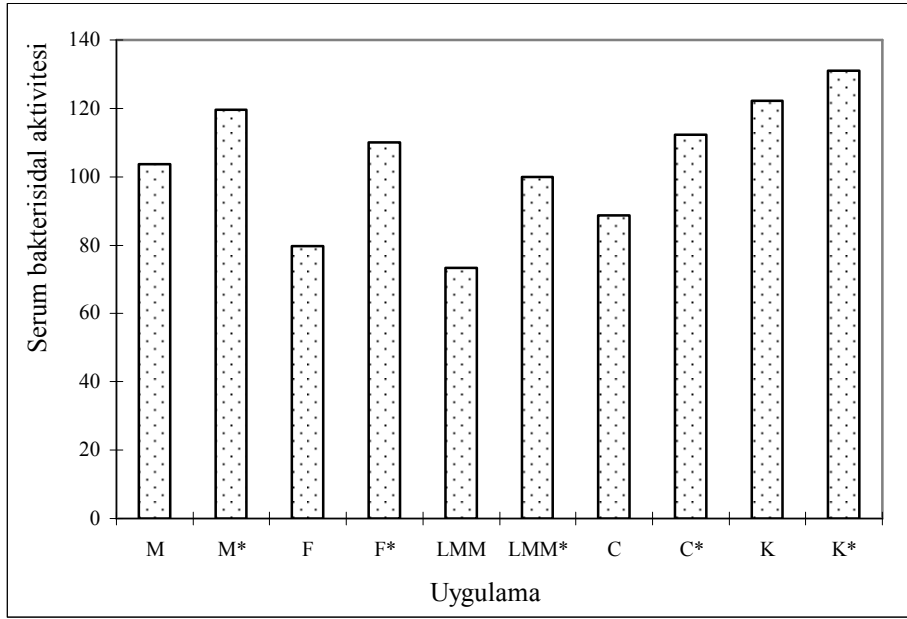
Çizelge 4.4. Chloramin-T uygulaması ile iyileşme periyodu sonrasında bazı stres ve bağışık yanıt parametrelerinin değişimi.

	Uygulama (Ortalama±SD)	İyileşme (Ortalama±SD)	Kontrol (Ortalama±SD)	Kontrol iyileşme (Ortalama±SD)	ANOVA P<0.05
Hematokrit (%)	28,69±3,63	28,86±2,59	29,23±4,06	28,04±3,56	0,41
Lökosit (%)	1,82±0,23 A	0,72±0,47 C	1,24±0,43 B	1,24±0,39 B	0,001 *
Hemoglobin (g/dL)	8,71±1,47	8,76±1,17	8,87±1,59	8,52±1,45	0,32
Plazma glukoz (mg/dL)	101,78±28,27 BC	118,03±33,23 C	49,55±8,18 AB	37,73±4,75 A	0,001 *
Albumin (g/dL)	1,87±0,31	2,20±0,68	2,09±0,31	1,96±0,22	0,72
Ceruloplasmin (mg/dL)	15,57±7,18	13,7±6,87	7,93±5,05	7,02±4,51	0,20
Total plazma proteini (g/dL)	7,31±0,60	6,78±1,29	6,78±1,03	6,96±0,43	0,80
Total Ig (g/dL)	2,24±0,75	2,75±0,68	3,77±1,26	3,76±0,72	0,08
Total Fe (μ mol/L)	26,23±18,8	23,92±10,08	15,31±11,93	22,86±12,74	0,23
Plazma lizozim ($\times 10^3$ U/dk)	0,183±0,009	0,117±0,008	0,196±0,0100	0,193±0,0104	0,46

Chloramin-T uygulaması, gökkuşığı alabalıklarında lökokrit ve plazma glukoz değerlerini etkilemiştir ($P<0.05$). Lökosit değerleri uygulama sonrası kontrol değerlerinden yüksek bulunurken iyileşme periyodunda kontrol değerlerinin altında olduğu görülmüştür. Plazma glukoz değerleri, hem Chloramin-T uygulamasında hem de iyileşme periyodunda kontrole göre çok yükselmiştir.

Antimikrobiyel Madde (Malaşit yeşili, Formalin, LMM, Chloramin-T)Uygulamalarının Serum Bakterisidal Aktivitesine Etkisi

Serum bakterisidal aktivitesi tüm antimikrobiyel madde uygulamalarında hafif düzeyde azalmış ancak iyileşme periyodunda kontrol değerlerine dönmüştür (Şekil 4. 1).



Şekil 4.1. Uygulama, iyileşme ve kontrol gruplarına ait serum bakterisidal aktivitesi değerleri (M:malaşit yeşili uygulama grubu, M*:malaşit uygulamasının iyileşme grubu, F:formalin uygulama grubu, F*: formalin uygulamasının iyileşme grubu, LMM:LMM uygulama grubu, LMM*:LMM uygulamanın iyileşme grubu, C:Chloramin-T uygulama grubu, C*: Chloramin-T iyileşme grubu, K:kontrol, K*: iyileşme gruplarının kontrolü)

V. Sonuç ve Öneriler

Su ürünleri yetiştiriciliğinde karşılaşılan sorunların başında hastalıklar ve buna bağlı olarak meydana gelen maddi kayıplar ve toplu balık ölümleri yer almaktadır. Su ürünleri sektörünün gelişmesine paralel olarak enfeksiyöz hastalıklarla mücadele amacıyla pekçok kimyasal kullanılmıştır. Dezenfeksiyon, intensif balık yetiştiriciliğinde büyük çapta kabul göre en ucuz ve pratik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Pironet

and Jones 2000). Ancak hastalıklarla mücadelede kabul gören bu uygulamanın balıklar üzerinde stres oluşturma düzeyi ve daha da önemlisi bağışık yanıtı etkileyip etkilemediği tam olarak çözümlenmiş bir konu değildir. Basit olarak, sorun, dezenfektan amaçlı yapılan uygulamaların gizli-tanımlanmamış bir stres kaynağı olup olmadığıdır. Balıklarda primer stres yanıtı, HPI eksenini ve Hipotalamik-kromaffin ekseninin aktivasyonudur. Bu aktivasyon ACTH, kortisol, katekolaminler ve glukoz sekresyonunun artmasına, dolayısıyla enerji mobilizasyonu ile metabolizma, hidromineral denge ve fizyolojik fonksiyonlarda değişimlere neden olur (Schreck 1981). Enerji kaynaklarının yeniden yapılanması, sağlık üzerinde olumsuz etkiler yaratır ve sonuçta immün sistem de etkilenecek, hayvanı hastalıklara açık duruma getirir. Basit olarak, stres bağışıklık sisteminin çalışmasını baskı altında tutar (Binuramesh et al. 2005). Bu çalışmada kısa süreli dezenfeksiyon işleminde, balığın verdiği fizyolojik yanıtın, stres ve non-spesifik immün yanıt boyutunda aydınlatılması hedeflenmiştir. Araştırmamızda gökkuşuğu alabalıkları (*O. mykiss*) 4 farklı antimikrobiyel maddeye (Malaşit yeşili, Formalin, Leteux-Meyer karışımı, Chloramin-T) literatürde önerilen dozlarda maruz bırakılmıştır. Ancak kısa süreli sayılabilecek bu uygulamaların geri dönüşümünü görmek için de bir gün (24 h) sonra tekrar örnekleme yapılmıştır (iyileşme periyodu).

Çalışmamızda seçtiğimiz antimikrobiyel maddeler balık yetiştiriciliğinde parazitisid, fungusid ve bakterisid olarak en fazla kullanılan maddelerdir (Treves-Brown 2000).

İncelediğimiz parametrelerden plazma glukoz seviyesinin her bir antimikrobiyel madde uygulaması sonrasında yükseldiği saptanmıştır. Sekonder stres parametrelerinden ölçümü en kolay ve en güvenilir olan bu parametreyi göz önüne aldığımızda çalışmada uygulanan madde, doz ve sürelerinin stres yarattığı belirtilebilir. Ancak tüm uygulamalarda 24 saatlik bir iyileşme periyodu sonrasında glukoz değerleri normale inmiştir. Buna göre çalışmamızda denediğimiz antimikrobisidlerin uygulanmasından kaynaklanan stresin geri dönüşümünden bahsedilebilir. Sekonder stres açısından diğer önemli bir parametre olan hematokrit sadece malaşit yeşili uygulamasında yükselmiştir. Bu, malaşit yeşilinin balıklarda anaerobik metabolizmayı hızlandırması ile ilgilidir. Hematokrit değerleri, uyguladığımız diğer maddelerde anormal bir sapma göstermemiş, normal sınırlar içinde kalmıştır. Analiz ettiğimiz parametrelerden en fazla dalgalanma

toplam demir değerlerinde gözlenmiştir. Bu dalgalanma balığın fizyolojik yanıtından ziyade elde edilen verilerdeki bireysel varyasyona bağlanmıştır. Non-spesifik bağışık yanıt parametreleri genel olarak önemli bir değişim göstermediğinden uygulanan antimikrobiyel maddelerin kısa süre içerisinde bağışık yanıtı olumsuz etkilemesinden söz etmek olası değildir. Özellikle lizozim aktivitesinin balıklarda stresin ardından baskılandığı bilinmektedir (Caruso and Lizard 1999).

Pickering and Pottinger (1985), 1 saat süreyle 2.27 ppm'lik malaşit yeşiline maruz bıraktıkları kahverengi alabalıkta kortisol seviyesinin arttığını, 4 hafta süren uygulama sonunda balıkta kortisol seviyesinin normale döndüğünü, diğer bir deyişle balığın adaptasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Srivastava et al. (1995a) 0.05-0.20 ppm lik malaşit yeşiline maruz bıraktıkları (96 saat, 10-20 gün) *Heteropneustes fossilis* te serum kalsiyum seviyesinin ve protein seviyesinin düştüğünü ama kronik uygulama (30-60 gün) sonucunda herhangi bir değişim olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 1.6 ppm'lik bir doz uygulanmıştır ve uygulama sırasında balıklarda mortaliteye rastlanmamıştır. Çalışmamızda malaşit yeşili uygulamasında plazma glukoz seviyesinin $83,16 \pm 46,10$ mg/dL değerine ulaştığı gözlenmektedir. 24 saatlik iyileşme periyodunda hafif bir düşüş ($64,51 \pm 8,91$ mg/dL) gözlenmesine rağmen bu değer de kontrol grubundan ($38.75-44.90$ mg/dL) yüksektir. Malaşit yeşili uygulamasında diğer parametrelerde istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı görülmektedir. Ancak deneme grubuna ait bireylerde iyileşme periyodunda demir miktarının arttığı gözlenmektedir. Bu bulgu transferrinin demir bağlama kapasitesinde bir azalma olduğunu düşündürebilir. Demir pekçok enzim sisteminde önemli bir kofaktör olarak iş görmektedir ve konak, serbest demir miktarını düşürerek, demirin patojenler tarafından kullanımını sınırlandırmaktadır (Bayne and Gerwick, 2001; Ellis, 2001). Ancak bu çalışmada ortaya çıkan durumun bireysel varyasyonla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Malaşit yeşili uygulaması non-spesifik sistemin çok önemli bir unsuru olan lizozim aktivitesini etkilememiştir. Ayrıca toplam Ig ve ceruloplazmin de değişim göstermemiştir.

Formalin hastalıklarla mücadelede çok uzun süredir immersiyon yöntemi ile kullanılan etkili ve nispeten ucuz bir kimyasaldır. Formalin en yaygın kullanılan parazitisid ve fungusid olarak en fazla çalışılmış kimyasaldır (Gieseke et al. 2006). Ancak daha çok etkinliği ve toksisitesi çalışıldığından sonuçlar kısmi bir bilgi sağlamaktadır. Kakuta et al., (1991) 280 ppm'lik formaline maruz bıraktıkları sazanlarda Hct ve plazma glukoz seviyesinin arttığını bulmuşlardır. Benzer şekilde Silveira-Coffigny et al. (2004), 1 mg/l lik doza maruz bıraktıkları *Oreochromis aureus*'ta 24 saatlik uygulama sonunda Hct ve nötrofil sayısının arttığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada ise 250 ppm'lik bir doz uygulanmış ve uygulama sırasında balıklarda mortalite gözlenmemiştir. Formalin uygulamasında plazma glukoz sekonder stres yanıtı olarak yükselmiş ancak daha sonra iyileşme periyodunda normale dönmüştür. Formalin uygulamasında dikkat çeken albumin ve total protein seviyesi ile toplam Ig değerlerinin deneme gruplarında azalmış olmasıdır. Balığın genel sağlık durumu ile ilgili genel bir fikir veren toplam protein değerlerinin deneysel gruplarda azalma göstermesi formalinin bu parametreleri etkilediği şeklinde yorumlanmıştır. Bu parametrelerin bakteriyel hastalıklarda protein yapısının bozulmasına bağlı olarak azaldığı bilinmektedir. Buna göre formalinin toplam protein üzerinde olumsuz etki gösterdiği sonucuna varılabilir. Benzer şekilde immunoglobulin sentezinin de formalin dezenfeksiyonu sırasında olumsuz etkilendiği söylenebilir. Formalin uygulamasında diğer parametrelerde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Hematokritin uygulanan formalin doz ve süresinde değişim göstermemiş olması, balığın oksijen alımıyla bir problemi olmadığını kanıtlamaktadır.

Leteux-Meyer karışımı pek çok ektoparazitik enfeksiyona karşı kullanılan formalin ve malaşit yeşilinden oluşan bir karışımdır. Bugüne kadar yaptığımız literatür taramasında Leteux-Meyer karışımının balığın fizyolojisine etkileri ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Treves-Brown (2000), tarafından önerilen 25 ppm'lik bir doz uygulanmıştır. Uygulama süresince balıklarda mortalite gözlenmemiştir. LMM uygulamasında incelenen parametrelerden sadece toplam Ig seviyesinde istatistiksel açıdan önemli derecede farklılık olduğu bulunmuştur. LMM karışımına maruz bırakılan balıklarda total Ig seviyesinin kontrol grubuna oranla düşük olduğu tespit edilmiştir. Formalin ve malaşit yeşili karışımından oluşan Leteux-Meyer

karışımının içindeki maddeler birlikte bulduklarında immunoglobulin sentezini etkileyebildikleri düşünülmektedir. Nitekim bu maddelerden formalin de Ig üzerinde böyle bir etki oluşturmuştur. Bununla birlikte istatistiksel açıdan önemli olmamakla birlikte glukoz ve ceruloplasmin seviyesinin deneme gruplarında kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Glukoz seviyesinin artması beklenen bir durumdur ve stres koşulları altında 200 mg/dL değerlerine kadar yükselbildiği bilinmektedir (Yavuzcan and Pulatsü, 1999). Ceruloplasmin ise bir co-faktör olarak pekçok enzim sisteminde iş gören Cu^{2+} in bağlanması ve patojenlerin kullanmasının sınırlandırılmasında görevlidir. Metal iyonu bağlayan proteinlerin (ceruloplasmin gibi) bağışık yanıtta temel görevi bakteri gelişimini engellemektir (Dalmo et al. 1997). Ancak tüm antimikrobiyeller uygulamalarından elde edilen sonuçlara ceruloplasmin açısından baktığımızda kontrol grupları arasında bile farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu bağlamda antimikrobiyel uygulama ile ceruloplasminin baskılandığını veya aktive olduğunu söylemek pek mümkün değildir.

Literatürde, Chloramin-T'nin balıklarda dezenfektan olarak kullanımını konu alan çalışma sayısı sınırlı sayıdadır ve bu çalışmaların büyük bir çoğunluğunda balık için lethal dozun belirlenmesi ve hastalık etmeninin ortamdaki eliminasyonu incelenmiştir. Powell and Perry (1998), 2-18 mg/l lik Chloramin-T'ye maruz bıraktıkları gökkuşuğu alabalığında serum Cl ve Na seviyesinin düştüğünü ve balığın osmoregülasyonunun bozulduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada ise 5 ppm'lik bir doz kullanılmıştır ve uygulama sırasında herhangi bir mortalite gözlenmemiştir. Chloramin-T uygulamasında glukoz seviyesinin 118 mg/dL'ye kadar yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca istatistiksel açıdan önemli olmamakla birlikte tıpkı LMM uygulamasında olduğu gibi ceruloplasmin seviyesinin deneme gruplarına oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Sağlıklı balık populasyonlarında lökosit değerinin %1'den az olması gerektiği bilinmektedir. Ancak stres, lökosit değerlerini artırabilmektedir (Caruso et al. 2002). Chloramin-T uygulamasını takiben lökosit değerlerindeki değişimler stresten kaynaklanmış olabilir. Fakat, Anderson (1990), lökosit sonuçlarının, deneyin güvenilirliğinin düşük olması nedeniyle dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir. Bu nedenle lökositin stres parametresi olarak çok değerli olmadığı sonucuna varılabilir.

Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi serum bakterisidal aktivitesi değerleri antimikrobiyel

maddeye maruz bırakılan balıklarda kontrol grubuna oranla düşüktür. En yüksek serum bakterisidal aktivite değeri kontrol-iyileşme grubunda, diğer bir deyişle stresi elimine olan balıklarda görülmektedir. En düşük serum bakterisidal aktivite değeri LMM'a maruz bırakılan balıklarda, daha sonra da Formaline maruz bırakılan balıklarda görülmektedir. Ancak tüm deneme gruplarında iyileşme peryodunda az da olsa serum bakterisidal aktivite değerlerinin yükseldiği görülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda uyguladığımız konsantrasyon ve süre kapsamında antimikrobiyel madde olarak malaşit yeşili, formalin, Leteux-Meyer karışımı ve Chloramin-T'nin alabalıklarda çok büyük bir hassasiyet yaratmadığı belirtilebilir. İncelenen parametreler genel olarak değerlendirildiğinde akut stres bağı olarak glukozun belirli bir süre artması normal kabul edilebilir. Önemli olan yetiştiricilik sisteminde fakültatif patojen patlaması ve infeksiyonlar bakımından, akut stresten sonraki bir-iki kritik gündür (Cnaani et al. 2004). Bu çalışmadaki bulgularımıza göre akut stres yanıtı olan yüksek glukoz 24 saat sonra normale dönmektedir. Yüksek metabolik gereksinime yanıt olarak temel organlara oksijen sağlamadaki artış bağlamında 'aşırı' hematokrit yükselmesi hiçbir uygulamada saptanmamıştır. Hafif hematokrit artışı kabul edilebilir seviyelerdedir. Lökosit değişimlerinin, strese ilgili bazı çalışmalarda bizim çalışmamızdaki bulgularla paralel olduğu görülmektedir (Cnaani et al., 2004). Ancak non-spesifik parametrelerden özellikle plazma lizozim aktivitesinin değişmemiş olması, ceruloplasmin değerlerinin aşırı dalgalanma göstermemesi esasen kullandığımız antimikrobiyellerin belirtilen doz ve sürelerde non-spesifik sistemi çok fazla etkilemediği şeklinde yorumlanabilir. Ancak bazı uygulamalarda Ig'nin düşmesi ve serum bakterisidal aktivitenin azalması yine de antimikrobiyel uygulamalardan kaynaklanan stresin büyüklüğüne bağlı olarak bağışıklık sisteminin bazı unsurlarının etkilenebileceği görülmektedir. Çalışmamızda denediğimiz maddelerin önerilen doz ve sürelerde kullanımıyla alabalıklarda toleransı aşabilen stresten ya da bağışık sistem baskılanmasından bahsetmek pek olası değildir. Ancak burada belirtilmesi gereken nokta malaşit yeşili ile bu maddenin içinde bulunduğu Leteux-Meyer karışımının kullanımının Avrupa Birliği'nde kullanılmasının yasak olduğudur. Her ne kadar özellikle fungal enfeksiyonların çözümünde malaşit yeşilinin yerine geçecek başka bir madde bulunmasa da AB bu maddeyi kanserojen etkileri nedeniyle yasaklamıştır. Amerika'da ve Avustralya'da kullanılması nedeniyle malaşit

yeşili üzerinde çok tartışılan bir konu olma özelliğini korumaktadır (Srivastava et al.2004).

VI. Kaynaklar

Anderson, D.P. 1990. Immunological Indicators:effects of environmental stres on immune protection and disease outbreaks. In: Biological Indicators of Stres in Fish. American Fisheries Society Symposium 8, Maryland.USA.

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: 419-429.

Anonim.2003. Devlet İstatistik Enstitüsü.

Aydın, F., Köksal, G., Demir, N., Bekcan, S., Kırkağaç, M., Gözğözağ, E., Erban, S., Deniz, H., Maltaş, Ö., Arpa, H. 2005. Su ürünleri yetiştiriciliği ve politikalar. Türkiye Ziraat Mühendisleri 6. Teknik Kongresi. 3-7 Ocak, 2005. 791-802.

Binuramesh, C., Prabakaran, M., Steinhagen, D., and Dinakaran Michael, R. 2005. Effect of chronic stress on the immune responses in different sex ratio groups of *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 250:47-59.

Blaxhall, P. C., Daisley, K. W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5: 771-781.

Bullock, G.L., Herman, G.L., Waggy, C. 1991. Hatchery efficacy trials with chloramine-T for control of bacterial gill disease. J. Aquat. Anim. Health 3, 48–50.

Caraway, W. T. 1963. Macro and Micro Methods for the Determination of Serum Iron and Iron-Binding Capacity. Clin. Chem. 9(2): 188-199.

Caruso, D., Schulumberger, O., Dahm, C., and Proteau, J.P. 2002. Plasma lysozyme levels in sheatfish, *Silurus glanis* subjected to stress and experimental infection with *Edwardsiella tarda*. Aquaculture Research. 33: 999-1008.

Cnaani,A., Tinman,S., Avidar, Y., Ron,M. and Hulata, G. 2004. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis niloticus*, *O. Mossambicus* and two strains of *O.niloticus*. Aquaculture Research 35:1434-1440.

Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K., Bogwald, J. 1997. Non-specific defence mechanisms in

fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20: 241-273.

Ellis, A. E. 2001. Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 827-839.

Endo, M., Kumahara, C., Yoshida, T., Tabata, M. 2002. Reduced stress and increased immune response in tilapia kept under self-feeding conditions. *Fisheries Sci.* 68: 253-257.

Fajer-Avilla, E. J., Parra, I. S., Zarate, G. A., Contreas, R., Ramirez, J. Z., Betancourt, M. 2003. Toxicity of formalin bullseye puffer fish and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*. 223: 41-50.

Giesecker, C.M., Serfling, S.F. and Reimschuessel, R. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*. *Aquaculture* 253:120-129.

Hatting, J. 1976. Blood sugar as an indicator of stress in *Labeo copensis*. *J. Fish Biol.* 10: 91-195.

Hoffman, G. L., Meyer, F. P. 1974. *Parasites of freshwater fishes*. T.F.H. USA. 224 pp.

Iwama, G. and Nakanishi, T. 1996. *The Fish Immune System*. Academic Press. London. 380p.

Kakuta, I., Namba, K., Uematsu, K., Murachi, S. 1991. Physiological response of the fish, *C. carpio* to formalin exposure- I. Effects of formalin on urine flow, heart rate, respiration. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 100(3): 405-411.

Leteux, F., Meyer, F. P. 1972. Mixture of malachite green and formalin for controlling *Ichthyophthirius* and other protozoan parasites of fish. *Prog. Fish Cult.* 34(1): 21-26.

McLeay, D. J., Gordon, M. R. 1977. Leucocrit: A simple hematological technique for measuring acute stress in salmonid fish, including stressful concentrations of pulp mill effluent. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2164-2175.

Pelgrom, S. M. G. J., Lock, R. A. C., Balm, P. H. M., Bonga, W. 1995. Integrated physiological response of tilapia to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 32: 303-320.

- Pickering, A. D., Pottinger, T. G. 1985. Acclimation of the brown trout *Salmo trutta* to the stress of daily exposure to malachite green. *Aquaculture*. 44(2): 145-152.
- Pillay, T.V.R. 1992. *Aquaculture and Environment*. Blackwell Scientific Publ. 189 pp.
- Pironet, F.N and Jones, J.B. 2000. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish. *Aquaculture International* 8: 349-361.
- Powell, M. D., Perry, S. F. 1998. Acid-base and ionic fluxes in rainbow trout during exposure to Chloramine-T. *Aquatic Toxicology*. 43: 13-24.
- Powell, M.D., Haman, F., Wright, G.M., Perry, S.F., 1998. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to a graded hypoxia following repeated intermittent exposure to chloramine-T. *Aquaculture* 165, 27– 39.
- Powell, M.D., Speare, D.J., MacNair, N., 1994. Effects of intermittent chloramine-T exposure on growth, serum biochemistry, and fish condition of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 1728–1736.
- Rodkey, F. L. 1965. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clinical Chemistry*. 11(4): 478-487.
- Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C. 2003. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin-B induced immunocompromised rohu. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 65-76.
- Sanchez, G., Speare, D.J., MacNair, N., Johnson, G., 1996. Effects of prophylactic chloramine-T treatment on growth performance and condition indices for rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health* 8, 278–284.
- Sarder, M. R. I., Thompson, K. D., Penman, D. J., McAndrew, B. J. 2001. Immune responses of Nile tilapia clones: I. Non-specific responses. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 37-46.
- Schreck, C. 1981. Stress and compensation in teleostan fishes; responses to social and physical factors. In: *Stress and fish* (Pickering A.D., eds). 295-321. London, Academic Press.
- Silveira-Coffingy, R., Prieto-Trujillo, A., Ascension-Valle, F. 2004. Effects of different stressors on hematological variables in cultured *Oreochromis aureus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 139: 245-250.

- Siwicki, A.K. and Anderson, D.P. 1993. Immunostimulation in Fish: Measuring The Effects of Stimulants by Serological and Immunological Methods. The Nordic Symposium on Fish Immunology, Lysekil, 19-22 May, Sweden.
- Smith, L. 1991. Introduction to Fish Physiology. Argent Lab. p. 352.
- Sneddon, L.U. 2006. Ethics and Welfare: Pain perception in fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 26(1):6-10.
- Srivastava, S.J., Singh, N.D., Srivastava, A.K., Sinha, R., 1995a. Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, *Heteropneustes fossilis*. Aquat. Toxicol. 31, 241–247.
- Srivastava, A.K., Sinha, R., Singh, N.D., Roy, D., Srivastava, S.J., 1995b. Malachite green induced changes in carbohydrate metabolism and blood chloride levels in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. Acta Hydrobiol. 37 (2), 113–119.
- Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. 2004. Toxicological effects of malachite green. Aquatic Toxicology 66: 319-329.
- Stober, Q.J., Dinnel, P.A., Hurlburt, E.F., DiJulio, D.H., 1980. Acute toxicity and behavioral responses of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and shiner perch (*Cymatogaster aggregata*) to chlorine in heated sea-water. Water Res. 14, 347– 354.
- Stoskopf, K. 1993. Fish Medicine. W. B. Saunders Comp. London. 883 pp.
- Svobodova, Z., Groch, L., Flajshans, M., Vykusova, B., Machova, J., 1997. Effect of long-term therapeutic bath of malachite green on common carp (*Cyprinus carpio*). Acta Vet. Brno 66 (2), 111–116.
- Treves-Brown, K. M. 2000. Applied Fish Pharmacology. Aquaculture Series No: 3. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. 309 pp.
- Yavuzcan, H. Y., Pulatsu, S., 1999. Evaluation of the secondary stress response in healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) after treatment with a mixture of formaline, malachite green and methylene blue. Aquacult. Res. 30 (5), 379–383.
- Westgard, J. O., Poquette, M. A. 1972. Determination of serum albumin with the SMA12/60 by a bromocresol green dye-binding method. Clinical Chemistry. 18:647-653.

Teşekkür

‘Antimikrobiyel Madde Uygulamalarının Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Non-Spesifik Bağışık Yanıtta Etkilerinin Değerlendirilmesi’ konulu çalışmamıza destek sağlayan Ankara Üniversitesi BAP’a ve projemize balık ve teknik eleman yardımıyla katkıda bulunan Er-Su Su Ürünleri San. ve Tic. Ltd.Şti. adına Ziraat Mühendisi Atilla Ertürk’e teşekkürlerimizi sunarız.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje bütçesi ile ilgili harcamalar:alımı gerçekleştirilen malzemelerin listesi:

MALZEME KODU (sıra no)	MALZEME ADI	MALZEME MİKTARI	ÖLÇÜ BİRİMİ
1	Potasyum ferrisiyanit	100	g
2	<i>o</i> -toluidine	1	L
3	Thiourea	500	g
4	Bromocresol green	5	g
5	Succinic acid	500	g
6	Triton-X 100	250	mL
7	Bovine serum albumin	10	ampul
8	p-phenylenediamine	25	g
9	Asetik asit	2.5	L
10	Trikloroasetik asit	500	g
11	Amonyum asetat	500	g
12	TPTZ	5	g
13	Amonyum demir(II)sülfat heksahidrat	250	g
14	Demir klorür	500	g
15	Nitro blue tetrazolium	1	g

16	PBS (pH:7.4)	10'LUK	paket
17	May-Grunwald	2,5	L
18	Gelatin-veronal buffer (GVB ²⁺)	250	mL
19	Triptik Soy Broth	500x5	g
20	Triptik Soy Agar	500x5	g
21	MRS agar	500x4	g
22	MRS broth	500x4	g
23	Chloramin T	1	kg
24	Formalin	2.5	L
25	Malaşit yeşili	300	g
26	Maximum recovery diluent	500x4	g
27	Ethanol (ACS grade)	30	L
28	Methanol (ACS grade)	30	L
29	Mikrohematokrit tüp	15	adet
30	Mikrohematokrit tüp macunu	3	paket
31	Parafilm 75 m (10 cm)	3	adet
32	Eppendorf tüp 1.5 ml	1000	adet
33	Spektro küveti	500	adet
34	Mikroküvet (200-1000 mikrolitre)	500	adet
35	Otomatik pipet ucu	1000	adet
36	Petri 12x20	250	adet
37	Cam tüp 160x16	250	adet
38	Enjektör 5 ml lik	1000	adet
39	Öze plastik	100	adet
40	Eppendorf için rack (plastik)	2	adet

Hızlandırılmış proje kapsamında tüm sarf malzemeleri bir seferde proje başlangıcında satın alınmış ve projenin gerçekleştirilmesi aşamasında analizlerde kullanılmıştır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil): Projede makine ve techizat alımı yoktur.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar: Teknik ve bilimsel detaylar Kesim III'de bulunmaktadır.

d) Sunumlar: Projeye ilişkin henüz bir bildiri ya da teknik rapor sunulmamıştır.

e) Yayınlar: Proje bulgularının bilimsel dergide yayınlanabilmesi için çalışmalar devam etmektedir.