



## Gökkuşığı Alabalığı Yemlerine L-alliin ve Oleuropein İlavesinin Büyüme Performansı, Bazı Bağışıklık Parametreleri ve Hastalık Direnci (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) Üzerine Etkileri

Ebru YILMAZ<sup>1\*</sup> , Sebahattin ERGÜN<sup>2</sup> , Sevdan YILMAZ<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes University, Agriculture Faculty, Department of Aquaculture, 09100 Aydın-Turkey

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Marine Science and Technology, Department of Aquaculture, 17100 Çanakkale-Turkey

### Ö Z

Bu çalışmada, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerine L-alliin ve oleuropein takviyesinin balıkların büyüme performansı, serum biyokimyasal, immünolojik parametreleri ve hastalık direnci üzerine etkileri araştırılmıştır. Denemede, ortalama ağırlığı  $12,6 \pm 0,91$  olan 270 gökkuşığı alabalığı kullanılmıştır. Balık yemlerine L-alliin ve oleuropein 10 mg/kg oranında ilave edilmiştir. Balıklar deneme yemleri ile 60 gün beslenmişlerdir. Alabalık yemlerine L-alliin ilavesinin balıkların büyüme performansını artırdığı tespit edilmiştir. L- alliin ve oleuropeinin immünolojik parametreler üzerinde olumsuz bir etki göstermemiştir. Oleuropein ilaveli grupta, kolesterol seviyesinin, kontrol grubuna oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Gökkuşığı alabalığı, L-alliin, Oleuropein, büyüme performansı, immünolojik parametreler

### MAKALE BİLGİSİ

#### ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş : 01.06.2020

Düzeltilme : 04.09.2020

Kabul : 14.09.2020

Yayım : 29.12.2020

DOI:10.17216/LimnoFish.746677

#### \* SORUMLU YAZAR

ebruyilmaz@adu.edu.tr

Tel : +90 256 772 70 22/6482



### Effects of Supplementation Of L-alliin and Oleuropein into Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Feeds on Growth Performance, Some Immune Parameters and Disease Resistance (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*)

**Abstract:** The effects of L-alliin and oleuropein on growth performance, serum biochemical and innate immune parameters and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was investigated in the present study. In the experiment, 270 rainbow trout with an average weight of  $12.6 \pm 0.91$  were used. L-alliin and oleuropein were added to fish feeds at a rate of 10 mg / kg. Fish were fed with experimental diets for 60 days. The addition of L-alliin to the feed increased the performance of growth parameters. The results showed that L-alliin and oleuropein have no negative effect on immune parameters. Cholesterol level was found higher in Oleuropein added group rather than control group.

**Keywords:** Rainbow trout, L-alliin, Oleuropein, growth performance, immune parameters

#### Alıntılama

Yılmaz E, Ergün S, Yılmaz S. 2020. Gökkuşığı Alabalığı Yemlerine L-alliin ve Oleuropein İlavesinin Büyüme Performansı, Bazı Bağışıklık Parametreleri ve Hastalık Direnci (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) Üzerine Etkileri. LimnoFish. 6(3): 180-188. doi: 10.17216/LimnoFish.746677

### Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliğinde; hormonlar, antibiyotikler, vitaminler ve diğer bazı kimyasallar, büyüme destekleyicileri, antibakteriyel ve diğer kullanım amaçlarına yönelik olarak bilimsel araştırmalarda test edilmiştir (Jayaprakas ve Sambhu 1996). Test edilen bu kimyasalların balık ve karides yetiştiriciliğinde olumlu etkileri olmasına rağmen, balık ve karides kaslarında kalıntı bırakmaları nedeniyle kullanımları önerilmemektedir (Sambhu

1996). Antibiyotikler ayrıca larva büyümesini azaltabilir ve balık larvalarının savunma mekanizmalarını inhibe edebilirler. Antibiyotiklerin ve sentetik ilaçların çoğu duyarlılaşma reaksiyonu ve diğer istenmeyen yan etkiler göstermiştir (Citarasu, 2010). Küresel düzeyde, insanlar antibiyotiklerin olumsuz etkilerini anlamışlar ve doğal ürünler kullanmaya başlamışlardır (Fauci 1993). 2006 yılından bu yana, su ürünleri yetiştiriciliğinde büyüme destekleyici olarak antibiyotik kullanımı

AB'de tamamen yasaklanmıştır (Sanandakumar 2002). Bitkilerin, antioksidan ve antimikrobiyolojik aktiviteleri nedeniyle hastalık kontrolünde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir, ayrıca daha güvenli ve ucuzdur (Prasad ve Variyur 1993). Bitkisel ürünler ve hammaddeler dahil olmak üzere dünya bitkisel ilaç pazarının yıllık büyüme oranının % 5-15 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Küresel bitkisel ilaç pazarının 62 milyar dolar büyüklüğe ulaştığı ve 2050 yılına kadarda 5 trilyon dolar büyüklüğe ulaşacağı beklenmektedir (Maggon 2005).

Alkaloidler, flavanoidler, pigmentler, fenolikler, terpenoidler, steroidler ve uçucu yağlar gibi doğal bitkisel ürünlerin; anti-stres, büyümeyi teşvik edici, iştah uyarımı ve immünostimülasyon gibi çeşitli aktivitelerde etkili olduğu gözlemlenmiştir (Citarasu vd. 1998, 1999, 2002; Sivaram vd. 2004).

Sarımsak (*Allium sativum* L.), toplam 1.437.690 hektar hasat alanı ve yıllık 24.255.303 ton kuru tomurcuk üretimi ile dünyadaki en önemli sebzelerden biridir. Özellikle Çin, Hindistan gibi birçok yakın doğu ülkelerinde eski zamanlardan beri lezzet verici bir ajan ve geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Arora vd. 2005; FAO 2013). Sarımsak, antioksidan ve antimikrobiyal etkiler gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Goncagul ve Ayaz 2010; Touloupakis ve Ghanotakis 2010). Ayrıca, ateroskleroz (Durak vd. 2004), diyabet (Padiya vd. 2014), hipertrofik kardiyomyopati (Padiya vd. 2014), tromboz, inflamasyon, hipertansiyon ve hatta kanseri (Rose vd. 2005; Mithen 2006; Bongiorno vd. 2008; Zawistowski vd. 2018) önleyebildiği de bilinmektedir. S-allil-L-sistein sülfoksit (alliin), sarımsaktaki sistein sülfoksitlerin yaklaşık % 80'ini oluşturur. L-alliin (S-allil-L-sistein sülfoksit), L-sisteinden türetilen bir amino asittir. S-Allil-L-sistein sülfoksit (ACSO), antioksidan ve antienflamatuar aktiviteleri olan bir anti-aterosklerotik bileşiktir (Lawson 1998). Literatürde sarımsağın balıklar üzerindeki etkisiyle ilgili birçok çalışma (Shalaby vd. 2006; Nwabueze 2012; Kanani vd. 2014) olsa da içeriğindeki bileşenler bölgelere, mevsime, sıcaklığa, vb. birçok parametreye bağlı olarak değişeceğinden içeriğindeki etken maddelerin etkisinin araştırılması önem arz etmektedir. Bu çalışma kapsamında sarımsaktan elde edilen alliin'in gökkuşuğu alabalıkları üzerindeki etkisi ilk defa araştırılmış olacaktır.

Ayrıca, oleuropein yine doğal bir antimikrobiyal (Yıldız ve Uylaşer 2011) olup balıklar üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Oleuropein, zeytin meyvelerinde ve yapraklarında en çok çalışılan fenolik bileşiktir. Oleuropeinin in vitro çalışmalarda, gram-pozitif bakteriler, gram-negatif bakteriler ve mantarlar üzerinde (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*) yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. (Fleming vd. 1973; Pereira vd. 2007). Aynı zamanda, oleuropeinin kardiyoprotektif, antienflamatuar, antioksidan, anti-kanser, anti-anjiyojenik ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Sun vd. 2017).

2016 yılında 0.8 milyon ton üretim ile gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), dünyadaki toplam su ürünleri yetiştiriciliği üretiminin % 2'sini oluşturmuştur ve Atlantik somonundan sonra, dünyanın ikinci soğuk su kültür balığı türüdür (FAO 2016; Rashidian vd. 2018).

Son yıllarda gökkuşuğu alabalıkları ile ilgili yapılan balık besleme ve yetiştiricilik çalışmalarında, balıkların beslenme ortamı, yetiştiricilik şekli ve yemlere ilave edilen katkı maddelerinin, balıklarda büyüme parametreleri, kan parametreleri ve hastalık direnci üzerine etkileri incelenmektedir (Ramezanzadeh vd. 2019; Koshinski vd. 2020; Rufchaei vd. 2020; Heydari vd. 2020; Rashidian vd. 2020).

L-alliin ve oleuropein balık yemi katkısı olarak kullanılabilir önemli doğal kaynaklar olarak gözükmektedir. Literatürde bugüne kadar L-alliin ve oleuropeinin gökkuşuğu alabalıklarında büyüme performansı, kan parametreleri ve hastalık direnci üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada L-alliin ve oleuropeinin gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansı, kan parametreleri ve hastalık direncine etkisi araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

### Deneme Yeri, Deney Sistemi ve Balık

Deneme Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Canlı Kaynaklar Üretim Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Denemede 270 adet 12,06±0,91 g (ortalama±standart sapma) ağırlığında gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Besleme denemesinden önce balıklar 15 gün boyunca deneme ortamına adapte edilmişlerdir. Deneme kapalı devre sistemde yürütülmüştür. Sistemde 9 adet 140 L hacminde fiberglas tank olup bu tanklar çökeltme havuzu, kaba filtrasyon, kum filtre, biyolojik filtre ve ısıtma-soğutma ünitesine (Tuna Mac®, Çanakkale) bağlıdır. Deneme sisteminin günlük olarak su değişimi %10-15 oranında yapılmıştır. Deneme ünitesinin bulunduğu ortamın aydınlatılması 12 saat aydınlık/12saat karanlık olarak otomatik zamanlayıcılar yardımıyla sağlanmıştır.

Denemede her bir tanka 30 adet balık 3 tekrarlı olacak şekilde konmuştur. Kontrol yemine herhangi bir katkı ilave edilmemiştir. Deneme yemleri

içerisine alliin ve oleuropein 10 mg/kg oranlarında ilave edilmiştir.

### Deneme Yemleri

Alliin ve oleuropein ticari bir firmadan temin edilmiştir. Deneme yemi olarak yağsız ticari gökkuşacağı alabalığı yemleri (HEMYEM, HEMAKS MAKİNA SANAYİ TİCARET A.Ş.) kullanılmıştır (Tablo 1). Alliin ve oleuropein balık yağına karıştırılarak yağsız yemlere literatürde bildiriliği gibi ilave edilmiştir (Yılmaz ve Ergün 2018). Yemlerin besin değeri analizleri AOAC (1998) ve Folch vd. (1957)'e göre yapılmıştır.

**Tablo 1.** Deneme yemlerinin kimyasal kompozisyonları.

**Table 1.** Chemical composition of experimental feeds.

	Kontrol	L-alliin	Oleuropein
Kimyasal kompozisyon (% , kuru madde)			
Protein	35,9	36	36,2
Yağ	9,25	9,26	9,28
Kül	8,65	8,63	8,62
NÖM	36,2	36,11	35,9
Enerji (GE)	18,28	18,29	18,31

Nitrojensiz Öz Madde (NÖM) = Kuru madde - (yağ+kül+protein). Enerji 23,6 kJ/g protein, 39,5 kJ/g yağ, ve 17,0 kJ/g NFE' e göre belirlenmiştir.

### Balıklardan Kan Örneklerinin Alınması

60 günlük besleme denemesinden sonra balıklar 1 gün aç bırakılmış ve kan örnekleme yapılmıştır. Her bir tanktan 3 adet olmak üzere toplamda her bir deney grubu için 9 balık kan örnekleme için kullanılmıştır. Örnekleme için rastgele ve hızlıca yakalanan balıklar en kısa sürede 20 mg/L dozunda karanfil yağı ile 10 L lik plastik kova içinde bayıltılmışlardır (Iversen vd. 2003). Bayıltılan balıkların kanları alınmadan önce kana mukoza karışmasını önlemek amacıyla anal yüzgecinin hemen arkası %70'lik alkol emdirilmiş pamuk ile temizlenmiştir. Kaudal venadan kan örnekleme 2,5 mL lik plastik enjektörler yardımıyla yapılmıştır. Kan örnekleri hematolojik ve immunolojik analizler için K<sub>3</sub>EDTA, serum biyokimyası analizleri için ise jelli serum tüpleri içerisine alınmıştır. Serum analizleri için jelli tüplerdeki kan örnekleri 5000 g devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum -80 °C de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

### Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Analizleri

Deneme süresince deneme tanklarının sıcaklık, oksijen ve iletkenlik ölçümleri YSI Pro2030 su analiz cihazı yardımıyla gün aşırı olarak takip edilmiştir. pH ölçümleri HANNA (HI 2221) masa üstü pH metre ile iki günde bir ve toplam amonyak, nitrit ve nitrat

ölçümleri ticari kit (Spectroquant®) kullanılarak Optizen POP UV/VIS spektrofotometre ile haftalık olarak ölçülmüştür.

### Büyüme Performansı, Yemden Yararlanmanın Hesaplanması

Denemede büyüme performansı ve yemden yararlanmanın hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Yılmaz vd. 2018):

Yüzde Canlı Ağırlık Artışı CAA (%) = (Son Ağırlık g - Başlangıç ağırlığı g) / Başlangıç Ağırlığı x 100

Spesifik Büyüme Oranı: SBO (%Gün<sup>-1</sup>) = [Ln (Son ortalama ağırlık g) - Ln (Başlangıçtaki ortalama Ağırlık g)] / Deneme gün sayısı x 100

Yem Dönüşüm Oranı: YDO = Yem Tüketimi (g) / Ağırlık Kazanımı (g)

### Biyokimyasal Analizler

Serum biyokimyası analizleri glikoz, albümin, globülin, toplam protein, trigliserit ve kolesterol daha önce balık çalışmalarında kullanılan ticari kit (Bioanalytic Diagnostic Industry, Almanya) yardımıyla spektrofotometrik olarak (Optizen POP UV/VIS) belirlenmiştir (Yılmaz ve Ergün 2012).

### İmmunolojik Analizler

#### Respiratöri büst aktivitesi

Fagositlerin respiratöri büst aktivitesi kandaki aktif lökositlerin 96 kuyulu yapışması ve NBT pozitif hücrelerin verdiği tepkinin spektrofotometrik ölçümü ile tespit edilmiştir (Stasiak ve Baumann 1996; Yılmaz 2018). Kısaca, analizden 10-12 saat önce her bir örnek için 50 µL poli-l-lizin 96 kuyucuklu plakalara ilave edilmiş ve plaka +4 °C de bekletilmiştir. Sonrasında her bir balık için 50 µL kan örneği poli-L-lizin kaplı 96 plaka kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Devamında örnekler 1 saat inkübasyona bırakılmış ve üst faz atılıp örnekler HBSS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 100 µL NBT solüsyonu ilave edilmiş ve plaka 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Devamında hücreler %100 metanol ile 5 dakika fikse edilmiş ve 3 kez %70'lik metanol ile yıkanmıştır. Plakalar kuruduktan sonra her bir kuyucuğa 60 µL 2 M potasyum hidroksit ve 70 µL DMSO sırasıyla ilave edilmiş ve okumalar multiskan spektrofotometrede 620 nm de yapılmıştır.

#### Potansiyel öldürme aktivitesi

Potansiyel öldürme aktivitesinin tespit edilmesi için Siwicki ve Anderson (1993)'un bildirdikleri metod kullanılmıştır. Analizden 10-12 saat önce her bir örnek için 50 µL poli-l-lizin 96 kuyucuklu plakalara ilave edilmiş ve plaka +4 °C de bekletilmiştir. Sonrasında her bir balık için 50 µL kan örneği poli-L-lizin kaplı 96 plaka kuyucuklarına

yerleştirilmiştir. Devamında örnekler 1 saat inkübasyona bırakılmış ve üst faz atılıp örnekler HBSS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 100 µL NBT [içerisinde formalin ile öldürülmüş ve PBS ile yıkanmış *A. salmonicida* bakterisi (NBT solüsyonu içindeki bakteri yoğunluğu:  $1,5 \times 10^8$ ) bulunan solüsyonu ilave edilmiş ve plakalar 150 g de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. 30 dakika daha inkübasyondan sonra hücreler %100 metanol ile 5 dakika fikse edilmiş ve 3 kez %70 lik metanol ile yıkanmıştır. Plakalar kurduktan sonra her bir kuyucuğa 60 µL 2 M potasyum hidroksit ve 70 µL DMSO sırasıyla ilave edilmiş ve okumalar multiskan spektrofotometrede 620 nm de yapılmıştır.

#### **Lizozim aktivitesi**

Lizozim aktivitesinin tespit edilmesi için Nudo ve Catap (2011) bildirdikleri metot kullanılmıştır. Kısaca 25 µl serum örneği 175 µl *Micrococcus luteus* süspansiyonuna (pH 5,8) eklenerek ve 96 plakada örnekler 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Okumalar 450 nm de multiskan mikropilaka okuyucuda yapılmış ve standart kullanılarak (L6876 Sigma, Lysozyme from chicken egg white) µg/mL olarak standart eğriden hesaplanmıştır.

#### **Myeloperoksidaz aktivitesi**

Myeloperoksidaz aktivitesi literatürde bildirilen metotlarda bazı değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir (Quade ve Roth 1997; Kumari ve Sahoo 2006). Analiz için 10 µl serum örneği 90 µl HBSS solüsyonu ile seyreltilmiştir. Devamında bu karışıma 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride ve hidrojen peroksit içeren solüsyon ilave edilerek reaksiyon 2 dakika sonra 35 µl sülfirik asitle durdurulmuş ve 450 nm' de multiskan mikropilaka okuyucuda okumalar yapılmıştır (Quade ve Roth 1997).

#### **Hastalık Direnci Testi**

Bu proje kapsamında *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC, 33658) hastalık direnci testi için kullanılmıştır. *A. salmonicida* gece boyunca 22 °C'de Tryptic Soy Broth'da üretildi ve daha sonra yoğunluğu  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> olarak ayarlamak için iki kez PBS ile yıkandı. Besleme denemesinin sona ermesinden sonra 75 balık / grup intraperitoneal olarak 100 µL bakteriyel süspansiyon ( $1 \times 10^8$  CFU mL/PBS) bir insülin şırınga kullanılarak enjekte edildi. Tanktaki balık ölümleri günlük olarak izlendi ve ölü balıklar tanktan çıkartıldı. Ölüm oranı 20 günlük bir süre boyunca kaydedilmiştir. Ayrıca, ölümlerin *A. salmonicida* bakteriyel

enfeksiyonundan kaynaklandığından emin olmak için ölü balıklardan yeniden izole işlemi yapılmış ve izolatları tanımlamak için 16S rDNA analizi yapılmıştır.

#### **İstatistiksel Analizler**

Analizlerden elde edilen verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Verilerin normal dağılım göstermesi ve homojen olması durumunda Tukey çoklu karşılaştırma testi, normal dağılım göstermeyen, homojen verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve homojen olmayan verilerin karşılaştırılmasında Tamhane testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 19 (IBM SPSS Statistics 19) programı kullanılarak  $p < 0,05$  önemlilik seviyesinde değerlendirilmiştir.

#### **Bulgular**

##### **Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları**

Deneme süresince, su sıcaklığı 16,2-16,3 °C, oksijen 7,0-7,7 mg/l, iletkenlik 415-445 µs cm<sup>-1</sup>, pH 7,0-7,4, toplam amonyak 0,015-0,010 mg/l, Nitrit 0,01-0,02 mg/l ve Nitrat 0,11-0,19 mg/l olarak tespit edilmiştir.

##### **Büyüme Performansı Bulguları**

L-alliin ve oleuropein katkılı (10 mg/kg) ve katkısız (kontrol) yemlerle beslenen balıkların büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları Tablo 2'de gösterilmiştir. Yeme 10 mg/kg oranında L-alliin ilavesi balıkların spesifik büyüme oranını (SBO), ağırlık artışını ve ağırlık artışı (%) olumlu oranda etkilemiştir ( $p < 0,05$ ).

##### **İmmunolojik Bulgular**

Besleme denemesi sonunda balıkların immünolojik parametrelerden respiratöri büst aktivitesi, potansiyel öldürme aktivitesi, lizozim ve MPO bulguları Tablo 4'de verilmiştir. Deneme yemlerine L-alliin ve oleuropein ilavesinin lizozim aktivitesini kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli oranda arttırdığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Potansiyel öldürme aktivitesi ise L-alliin ve oleuropein ilaveli gruplarda kontrole göre önemli derecede yüksek çıkmıştır ( $p < 0,05$ ).

##### **Ölüm Oranı Bulguları**

Çalışma sonunda balıkların *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* patojenine karşı hastalık dirençleri bulguları Tablo 5'de gösterilmiştir. Test sonucunda yeme 10 mg/kg oranında L- alliin ve oleuropein ilavesinin en düşük yaşama oranına sahip olduğu bulunurken, kontrol grubu en yüksek yaşama oranına sahip olarak bulunmuştur.

**Tablo 2.** Deneme gruplarına göre büyüme parametrelerindeki değişimler**Table 2.** Changes in growth parameters of experimental groups

	Deneme grupları		
	Kontrol	10 mg/kg L-alliin	10 mg/kg Oleuropein
Deneme başı ortalama balık ağırlığı (g)	12,08±0,13 <sup>a</sup>	12,21±0,05 <sup>a</sup>	12,20±0,65 <sup>a</sup>
Deneme sonu ortalama balık ağırlığı (g)	35,11±0,37 <sup>c</sup>	38,67±0,74 <sup>a</sup>	35,57±2,57 <sup>b</sup>
SBO (% gün <sup>-1</sup> )	1,78±0,00 <sup>b</sup>	1,92±0,03 <sup>a</sup>	1,66±0,05 <sup>c</sup>
AA	437,50±4,50 <sup>b</sup>	502,67±13,58 <sup>a</sup>	394,22±7,39 <sup>c</sup>
YT	476,58±15,36 <sup>a</sup>	470,00±7,00 <sup>a</sup>	461,08±7,34 <sup>a</sup>
YDO	1,09±0,04 <sup>a</sup>	0,93±0,02 <sup>b</sup>	1,17±0,04 <sup>a</sup>
AA (%)	190,63±0,12 <sup>b</sup>	216,66±5,54 <sup>a</sup>	170,33±8,51 <sup>c</sup>

**Tablo 3.** Deneme gruplarına göre serum biyokimyasal parametrelerindeki değişimler.**Table 3.** Changes in serum biochemical parameters of experimental groups.

Serum biyokimyası Parametreleri	Deneme Grupları		
	Kontrol	10 mg/kg L-alliin	10 mg/kg Oleuropein
ALT (U/L)	20,56± 3,97 <sup>a</sup>	15,46± 4,16 <sup>b</sup>	13,45± 3,34 <sup>b</sup>
AST (U/L)	112,30± 2,69 <sup>a</sup>	128,43± 32,70 <sup>a</sup>	130,03± 19,80 <sup>a</sup>
LDH (U/L)	998,53± 82,43 <sup>a</sup>	748,02±111,22 <sup>b</sup>	1018,35±145,60 <sup>a</sup>
ALP (U/L)	425,33±57,11 <sup>a</sup>	456,77±63,84 <sup>a</sup>	479,38±162,41 <sup>a</sup>
GLI (mg/dL)	115,34±42,61 <sup>a</sup>	74,70±17,34 <sup>b</sup>	68,72±10,56 <sup>b</sup>
Tprot (g/dL)	10,37±0,82 <sup>a</sup>	10,64±0,67 <sup>a</sup>	9,92±0,27 <sup>a</sup>
ALB (g/dL)	0,78±0,05 <sup>ab</sup>	0,85±0,07 <sup>a</sup>	0,71±0,10 <sup>b</sup>
GLO (g/dL)	9,59±0,82 <sup>a</sup>	9,79±0,61 <sup>a</sup>	9,21±0,28 <sup>a</sup>
TRIG (mg/dL)	201,01±17,51 <sup>a</sup>	206,63±26,63 <sup>a</sup>	195,30±20,01 <sup>a</sup>
KOL (mg/dL)	270,31±27,90 <sup>b</sup>	296,73±31,31 <sup>ab</sup>	304,79±13,75 <sup>a</sup>

n=9, Ortalama ±standart hata. Aynı satırda farklı üstel harfler içeren gruplar istatistiksel açıdan diğer gruplardan farklıdır. ALT: Glutamik Pirüvik Transaminaz, AST: Glutamik Oksaloasetik Transaminaz, LDH: Laktat Dehidrogenaz, ALP: Alkalen Fosfat, GLI: Glikoz, Tprot: Toplam protein, ALB: Albumin, GLO: Globulin, TRIG: Trigliserit, KOL: Kolesterol.

**Tablo 4.** Deneme gruplarına göre immunolojik parametrelerindeki değişimler.**Table 4.** Changes in immunological parameters of experimental groups.

İmmunolojik Parametreler	Deneme Grupları		
	Kontrol	10 mg/kg L-alliin	10 mg/kg Oleuropein
Respiratöri bürst aktivitesi (OD 620)	0,13±0,02 <sup>b</sup>	0,23±0,07 <sup>a</sup>	0,20±0,03 <sup>a</sup>
Potansiyel öldürme aktivitesi	0,20±0,01 <sup>c</sup>	0,49±0,06 <sup>a</sup>	0,31±0,08 <sup>b</sup>
Lizozim aktivitesi (µg/mL)	16,48±2,39 <sup>b</sup>	27,53±3,60 <sup>a</sup>	28,63±5,40 <sup>a</sup>
MPO (450 nm)	0,40±0,04 <sup>a</sup>	0,32±0,09 <sup>a</sup>	0,40±0,08 <sup>a</sup>

n=9, Ortalama ±standart hata. Aynı satırda farklı üstel harfler içeren gruplar istatistiksel açıdan diğer gruplardan farklıdır.

**Tablo 5.** Deneme gruplarına göre ölüm oranındaki değişimler.**Table 5.** Changes in mortality rate experimental groups.

	Deneme grupları		
	Kontrol	10 mg/kg L-alliin	10 mg/kg Oleuropein
Hastalık bulaştırılan balık sayısı	75	75	75
% Ölüm oranı	50,66	54,66	54,66

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma sonucunda yeme L-alliin ilavesinin balıkların büyüme performansını arttırdığı

belirlenmiştir. Benzer olarak farklı çalışmalarda balık yemine ilave edilen sarımsak katkısının balıkların büyüme performansına olumlu etki yaptığı

bildirilmiştir (Diab vd. 2002; Abou-Zeid 2002; Shalaby vd 2006; Metwally 2009; Nya ve Austin 2009; Abdel-Hakim vd. 2010).

Serum biyokimyası parametreleri balık yemine ilave edilen katkıların balık sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılan önemli göstergelerdir (Yılmaz vd. 2016). Ayrıca serum biyokimyası parametrelerindeki değişiklikler, parazitlerden ve toksik maddelerden kaynaklanan hastalık ve kirliliği göstermektedir. Örneğin, *Aeromonas*'a maruz kalan gökkuşuğu alabalığında ALT, LDH ve g-GT seviyelerinde artış rapor edilmiştir (Rehulka 2003). ALT, karaciğer bozukluklarının prognozunda optimum indikatördür (Shalaby 2005). Kan şekerindeki azalma, indikatörlerden biridir; sarımsak katkılı yem stress faktörlerine karşı savaşır (Sahu vd. 2007). Xie vd. (2008) yaptıkları çalışmada antrakinin ile beslenen sazan (*Cyprinus carpio* var. Jian) balıklarında, hem glikoz hem de kortizol seviyelerinin akut stresten sonra arttığını bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ALT ve GLI değerleri, L-alliin ve oleuropein ile beslenen balıklarda kontrol grubundaki balıklara göre önemli oranda düşük çıkmıştır ( $p < 0,05$ ).

Sarımsak, hepatik p-hidroksi-p-metilglutaryil koenzim A (HMG-CoA) redüktaz, kolesterol 7 $\alpha$ -hidroksilaz ve yağ asidi sentezi üzerinde doza bağlı bir inhibisyon etkisine sahiptir (Qureshi vd. 1983). Bu çalışmada, KOL değerinin L- alliin ilaveli gruplarda kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Bizim çalışmamızın aksine araştırmacılar sarımsak ekstraktlarının serum kolesterol seviyelerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Bordia vd. 1975; Augusti 1977). Farklı bir çalışmada ise Carrijo vd. (2005), % 1'e kadar sarımsak tozu içeren bir diyetle civcivleri besledikten sonra kolesterol ve triasilgliserol seviyelerinde herhangi bir değişiklik bildirmemiştir. Ancak, literatürde L-alliin ilavesinin balıklar üzerindeki etkisi ilk defa bu çalışma ile araştırıldığından derin bir tartışma yapılamamaktadır. Oleuropein bu çalışmada kolesterolü önemli oranda arttırmıştır. Ancak, bu katkının farelerde yüksek kolesterollü diyet durumlarında kolesterol düşürücü olduğu bilinmektedir (Hadrich vd. 2016). Ancak, balıklardaki etkisi farklı olabilir. Örneğin, sazan balığı yemine oleuropein açısından zengin zeytin yaprağı ekstresi ilavesi yüksek dozda kolesterol seviyelerini arttırmıştır (Zemheri-Navruz vd. 2019). Normal şartlarda bu durum sağlık durumunun olumsuz etkilendiğinin bir göstergesidir. Ancak, bu çalışmada balıkların bağışıklık durumu ve hastalık direncine bakıldığında sağlık açısından olumsuz bir

etki gözükmemektedir. Bu nedenle ileride daha detaylı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada yeme L-alliin ve oleuropein ilavesi, balıkların lizozim, respiratörü büst aktivitesi ve potansiyel öldürme aktivitelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar balık yemine L-alliin ve oleuropein ilavesinin balık bağışıklığını olumlu etkilediğinin birer göstergesi olarak kabul edilebilir. Benzer olarak yeme sarımsak (0,5 g/kg) ilavesinin juvenil hibrit tilapyalarda lökosit sayısı, fagositik aktivite, fagositik indeks, respiratörü büst aktivitesi ve lizozim aktivitesini önemli oranda arttırdığı tespit edilmiştir (Ndong ve Fall 2011). Yine sazan balığı yemine oleuropein açısından zengin zeytin yaprağı ekstresi ilavesi balıkların bağışıklık parametrelerini arttırmıştır (Zemheri-Navruz vd. 2019).

Bu çalışmada yeme eklenen L-alliin ve oleuropein balıkların *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* patojenine karşı yaşama oranını değiştirmemiştir. Ancak, alabalık yemlerine 10 mg/kg oranında L-alliin ilavesinin balıkların büyüme performansını arttırdığı, L- alliin ve oleuropeinin genel olarak serum biyokimyası parametreleri iyileştirdiği ve immunolojik parametreleri arttırdığı belirlenmiştir. İleriki çalışmalarda farklı balık patojenleri üzerine L-alliin ve oleuropeinin etkileri araştırılabilir.

## Etik Kurul Onayı

Bu çalışmanın Hayvan Deneyleti Etiği açısından uygun olduğu Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Hayvan Deneyleti Yerel Etik Kurulu (Karar Numarası 2019/04-02) tarafından onaylanmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FHD-2019-2989 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Abdel-Hakim NF, Lashin MME, Al-Azab AAM, Ashry AM. 2010. Effect of fresh or dried garlic as a natural feed supplement on growth performance and nutrients utilization of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egypt J Aquat Biol Fish. 14(2):19–38.  
doi: 10.21608/EJABF.2010.2058
- Abou-Zeid SM. 2002. The Effect of Some Medical Plant on Reproductive and Productive Performance of Nile tilapia Fish [Ph.D. Thesis]. Cairo University. 212 s.
- AOAC 1998. Official methods of analysis of AOAC International (16th ed., 4th Rev.). AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 985.18.
- Arora A, Tripathi C, Shukla Y. 2005. Garlic and its organosulfides as potential chemopreventive agents: A review. Current Cancer Therapy Reviews. 1(2):199–205.  
doi: 10.2174/1573394054021772

- Augusti K.T. 1977. Hypocholesterolaemic effect of garlic, *Allium sativum*, Linn. *IJEB*. 15:489–490.
- Bongiorno PB, Fratellone PM, LoGiudice P. 2008. Potential health benefits of garlic (*Allium sativum*): A narrative review. *J Complement Integr Med*. 5(1):1-24.  
doi: 10.2202/1553-3840.1084
- Bordia A, Bansal HC, Arora SK, Singh SV. 1975. Effect of essential oils of garlic and onion on alimentary hyperlipemia. *Atherosclerosis*. 21(1):15–19.  
doi: 10.1016/0021-9150(75)90091-x
- Carrijo AS, Madeira LA, Sartori JR, Pezzato AC, Goncalves JC, Cruz VC, Kuibida KV, Pinheiro DF. 2005. Powdered garlic in the alternative feeding of broiler chickens. *Pesqui Agropecu Bras*. 40(7): 673-679.  
doi: 10.1590/S0100-204X2005000700008
- Citarasu T, Immanuel G, Marian MP. 1998. Effects of feeding Artemia enriched with stresstol and cod liver oil on growth and stress resistance in the Indian white shrimp *Penaeus indicus* post larvae. *Asian Fish Sci*. 12:65–75.
- Citarasu T, Jayarani TV, Babu MM, Marian MP. 1999. Use of herbal bio-medicinal products in aquaculture of shrimp. Paper presented at: Aqua-Terr Annual Symposium; School of Biological Sciences, MK University, Madurai.
- Citarasu T, Sekar R.R. Babu M.M. Marian M.P. 2002. Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*. *Asian Fish Sci*. 15(1):21–32.
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult. Int*. 18: 403–414.
- Diab AS, El-Nagar GO, Abd-El-Hady YM. 2002. Evaluation of *Nigella sativa* L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic) and BIOGEN as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. *Suez Canal Vet Med J*. 5(2):745-753.
- Durak I, Aytac B, Atmaca Y, Devrim E, Avci A, Erol C, Oral D. 2004. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life Sci*. 75(16):1959-1966.  
doi: 10.1016/j.lfs.2004.04.015
- FAO. 2013. FAO Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations 289 s.
- FAO. 2016. Aquaculture Department, The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 204. ISBN 978-92-5-109185-2.
- Fauci AS. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus: implications for therapy. *Science*, 262(5136):1011–1018.  
doi: 10.1126/science.8235617
- Fleming HP, Walter WM, Jr. Etchells JL. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl Microbiol*. 26(5):777–782.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 226(1):497-509.
- Goncagul G, Ayaz E. 2010. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine. *J Anim Vet Adv*. 9(1):1-4.  
doi: 10.3923/javaa.2010.1.4
- Hadrich F, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Feki I, Isoda H, Feve B, Sayadi S. 2016. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chem-Biol Interact*. 252: 54-60.  
doi: 10.1016/j.cbi.2016.03.026
- Heydari H, Firouzbakhsh F, Paknejad H. 2020. Effects of *Mentha longifolia* extract on some blood and immune parameters, and disease resistance against yersiniosis in rainbow trout. *Aquaculture*. 515, 734586.  
doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734586
- Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA. 2003. The efficacy of metomidate clove oil aqui-s™ and benzoak® as anaesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*. 221(1-4):549-566.  
doi: 10.1016/S0044-8486(03)00111-X
- Jayaprakas V, Sambhu C. 1996. Growth response of white prawn, *Penaeus indicus* to dietary L-carnitine. *Asian Fish Sci*. 9(3):209–219.
- Kanani H.G, Nobahar Z, Kakoolaki S, Jafarian H. 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. *Fish Physiol Biochem*. 40(2):481-490.  
doi: 10.1007/s10695-013-9859-6
- Koshinski R, Velichkova K, Sirakov I, Stoyanova S. 2020. Effect of *Angelica archangelica* L. extract on growth performance, meat quality and biochemical blood parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.), cultivated in a recirculating system. *Bulg J Agric Sci*. 26 (1) 232–237.
- Kumari J, Sahoo PK. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquac Res*. 37(5):500-509.  
doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01456.x
- Lawson LD. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Lawson LD, Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. Washington, D.C. American Chemical Society. 691(14):177-209.  
doi: 10.1021/bk-1998-0691.ch014
- Maggon K. 2005. Best selling human medicine 2002–2004. *Drug Discov Today*. 10(11):739-742.  
doi: 10.1016/S1359-6446(05)03468-9
- Metwally MAA. 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World J Fish Mar Sci*. 1(1): 56-64.
- Mithen R. 2006. Sulphur- containing compounds. In: Crozier A, Clifford N and Ashida H editors. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet* Hoboken, NJ: Blackwell Publishing. s. 25- 46.
- Ndong D, Fall J. 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*).

- Journal of Clinical Immunology and Immunopathology. 3(1):1-9.
- Nudo LP, Catap ES. 2011. Immunostimulatory effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice. J Ethnopharmacol. 133(2):613-620.  
doi: 10.1016/j.jep.2010.10.044
- Nwabueze AA. 2012. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and haematological parameters of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Sustainable Agric Res. 1(2):222-228.  
doi: 10.22004/ag.econ.231382
- Nya EJ, Austin B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis. 32(11):963-970.  
doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01100.x
- Padiya R, Chowdhury D, Borkar R, Srinivas R, Pal Bhadra M, Banerjee SK. 2014. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. PLoS One. 9(5):e94228.  
doi: 10.1371/journal.pone.0094228
- Pereira A.P, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade F, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules. 12(5):1153-62.  
doi: 10.3390/12051153
- Prasad S, Variyur PKB. 1993. Chemical investigation of some commonly used spices. Aryavaidyan. 6(4):262-267.
- Quade M.J., Roth J.A. 1997. A rapid direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. Vet Immunol Immunop. 58(3-4):239-248.  
doi: 10.1016/s0165-2427(97)00048-2
- Qureshi AA, Din ZZ, Abuirmeileh N, Burger WC, Ahmad Y, Elson CE. 1983. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: impact on serum lipids. J. Nutr. 113(9):1746-1755.  
doi: 10.1093/jn/113.9.1746
- Ramezanzadeh S, Abedian K, Esmaeili M. 2019. Immunohematological parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed supplemented diet with different forms of barberry root (*Berberis vulgaris*). Comparative Clinical Pathology. 29,177-187.  
doi: 10.1007/s00580-019-03032-8
- Rashidian G, Bahrami S, Farsani MN, Prokić MD, Faggio C. 2018. The oak (*Quercus brantii*) acorn as a growth promotor for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): growth performance, body composition, liver enzymes activity and blood biochemical parameters. Nat Prod Res. 34(17):2413-2423.  
doi: 10.1080/14786419.2018.1538994
- Rashidian G, Kajbaf K, Prokić MD, Faggio C. 2020. Extract of common mallow (*Malva sylvestris*) enhances growth, immunity, and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings against *Yersinia ruckeri* infection. Fish Shellfish Immun. 96:254-261.  
doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.018
- Rehulka J. 2003. Hematological analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) affected by viral haemorrhagic septicaemia (VHS). Dis Aquat Organ. 56(3):185-193.  
doi: 10.3354/dao056185
- Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ. 2005. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: The chemistry of potential therapeutic agents. Nat Prod Rep. 22(3):351-368.  
doi: 10.1039/b417639c
- Rufchaei R, Mirvaghefi A, Hoseinifar SH, Valipour A, Nedaei S. 2020. Effects of dietary administration of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaves extracts on innate immune parameters, antioxidant defence and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 515: 734533.  
doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734533
- Sahu S, Das BK, Mishra BK, Pradhan J, Sarangi N. 2007. Effects of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. J Appl Ichthyol. 23(1):80-86.  
doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00785.x
- Sambhu C. 1996. Effect of hormones and growth promoters on growth and body composition of pearlspot, *Etroplus suratensis* and white prawn *Penaeus indicus* [Ph.D. Thesis]. University of Kerala. 215 p.
- Sanandakumar S. 2002. MPEDA asks aquafarms not to use banned antibiotics, Times News Network, 9 April 2002.
- Shalaby A. 2005. The opposing effect of ascorbic acid (Vitamin C) on Ochratoxin toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Paper presented at: 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture; Philipin.
- Shalaby AM, Shalaby YA, Khattab AM, Abdel R. 2006. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Venom Anim Toxins. 12(2):172-201.  
doi: 10.1590/S1678-91992006000200003
- Sivaram V, Babu MM, Citarasu T, Immanuel G, Murugadass S, Marian MP. 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture. 237(1-4):9-20.  
doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.03.014
- Siwicki AK, Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and macrophages lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. In: Siwicki AK, Anderson DP, Waluga J, editors. Disease diagnosis and prevention methods. FAO-project GCP/INT/JPA IFI Olsztyn, Poland: Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego. s. 105-112.
- Stasiak SA, Baumann PC. 1996. Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis. Fish Shellfish Immun. 6(7):537-539.  
doi: 10.1006/fsim.1996.0050



- Sun W, Frost B, Liu J. 2017. Oleuropein, unexpected benefits. *Oncotarget*. 8: 17409.  
[doi: 10.18632/oncotarget.15538](https://doi.org/10.18632/oncotarget.15538)
- Touloupakis E, Ghanotakis DF. 2010. Nutraceutical use of garlic sulfur-containing compounds. *Adv Exp Med Biol*. 698: 110-121.  
[doi: 10.1007/978-1-4419-7347-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_9)
- Xie J, Liu B, Zhou Q, Su Y, He Y, Pan L, Ge X, Xu P. 2008. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian. *Aquaculture*. 281(1-4):5-11.  
[doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.038](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.038)
- Yıldız G, Uylaşer V. 2011. Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein. *Uludağ Üniv Ziraat Fak Derg*. 25(1):131-142.
- Yılmaz S, Ergün, S. 2012. Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J Aquat Anim Health*. 24(4):219-224.  
[doi: 10.1080/08997659.2012.711266](https://doi.org/10.1080/08997659.2012.711266)
- Yılmaz S, Ergün S, Çelik EŞ. 2016. Effect of dietary spice supplementations on welfare status of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Proc Natl Acad Sci India Sect B: Biol Sci*. 86(1):229-237.  
[doi: 10.1007/s40011-014-0444-2](https://doi.org/10.1007/s40011-014-0444-2)
- Yılmaz S, Ergün S, Yığıt M. 2018. Effects of dietary FARMARIN® XP supplement on immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 496:211-220.  
[doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.024](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.024)
- Yılmaz S. 2018. Balık immunolojisi analiz yöntemleri/Methods of fish immunology analysis. İstanbul: Paradigma Akademi Yayınları 105 s.
- Yılmaz S, Ergün S. 2018. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish Shellfish Immun*. 78:140-157.  
[doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.034](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.034)
- Zawistowski J, Kopec A, Jedrszczyk E, Francik R, Bystrowska B. 2018. Garlic grown from air bulbils and its potential health benefits. *ACS Symp Ser*. 1286: 315- 328.  
[doi: 10.1021/bk-2018-1286.ch017](https://doi.org/10.1021/bk-2018-1286.ch017)
- Zemheri-Navruz F, Acar Ü, Yılmaz S. 2019. Dietary supplementation of olive leaf extract increases haematological, serum biochemical parameters and immune related genes expression level in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immun*. 89:672-676.  
[doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.037](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.037)