

Tıbbi Bitki Özütlerinin Melek Balığı (*Pterophyllum scalare*) Yumurtasının Açılımı Üzerine Etkisi

Sevdan YILMAZ *✍️ Sebahattin ERGÜN *

* Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, TR-17100 Çanakkale, TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-5203

Özet

Bu çalışmada, bazı kimyasallar ve tıbbi bitki özütlerinin melek balığı (*Pterophyllum scalare*) yumurta açılımı ve sudaki bakteri yükü üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla metilen mavisi 0.5 ppm ve potasyum permanganat 0.2 ve 0.4 ppm uygulanmıştır. Biberiye, civanperçemi ve sumak özütlerinin herbiri ise 1.000, 5.000 ve 10.000 ppm olarak uygulanmıştır. Metilen mavisi 0.5 ppm, potasyum permanganat 0.2 ppm, biberiye 1.000, 5.000, ve 10.000 ppm ve civanperçemi 5.000 ppm uygulamaları sudaki bakteri yükünü azaltmış ve yumurta açılımını önemli oranda arttırmıştır ($P<0.05$). Biberiye özütünün konsantrasyonu arttıkça bakteri yükü azalmış ve yumurta açılımı artmıştır. Tüm sumak uygulamaları bakteri yükünü azaltmış, ancak yumurta açılımını olumsuz etkilemiştir. Elde edilen bulgular yumurta açılımı için en uygun tıbbi bitki özütünün biberiye olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışmada biberiye özütünün sentetik kimyasallar yerine kullanımının daha uygun ve melek balığı yumurta açılımı için optimum biberiye özüt dozajının 1.000 ppm olduğu bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Pterophyllum scalare*, Yumurta açılımı, Metilen mavisi, Potasyum permanganat, Biberiye, Sumak, Civanperçemi

Effects of Medicinal Herb Extracts on Egg Hatching of the Angel Fish (*Pterophyllum scalare*)

Summary

In this study, the effects of sythetic chemicals and medicinal herbs on the amount of bacteria in egg water and egg hatching of the angel fish (*Pterophyllum scalare*) were investigated. In this goal, methylene blue exposed to 0.5 ppm and potassium permanganate exposed to 0.2 and 0.4 ppm. Each rosemary, yarrow and sumac extracts exposed to 1.000, 5.000 and 10.000 ppm. Methylene blue (0.5 ppm), potassium permanganate (0.2 ppm), rosemary (1.000, 5.000, and 10.000 ppm) and yarrow (5.000 ppm) treatments were significantly decreased bacterial loads and increased egg hatching ($P<0.05$). With the increasing in the concentration of rosemary extract the bacterial loads decreased and egg hatching increased. All sumac treatments were significantly decreased total bacterial loads, but were negatively affected on egg hatching. The findings were shown that the best group was rosemary for egg hatching. Finally, this study showed that rosemary extract was more suitable to use instead of sythetic chemicals, and optimum rosemary extract dose was 1.000 ppm for the hatching of the angel fish eggs.

Keywords: *Pterophyllum scalare*, Egg hatching, Methylene blue, Potassium permanganate, Rosemary, Sumac, Yarrow

GİRİŞ

Yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde yumurta açılımının yüksek olması hedeflenmektedir. Bu amaçla ekonomik öneme sahip birçok balık türünde metilen mavisi, potasyum permanganat, hidrojen peroksit, formalin, bakır sülfat, glutaraldehit ve iyot gibi kimyasallar kullanılmıştır¹⁻³. Melek balıkları da ilk kez 1909 yılında üretilmiş olup ticari ve hobi amaçlı olarak 50 yıldır üretilmektedir⁴. Bu balıkların

yetiştiriciliğinde en büyük sorunlardan biri yumurta açılımının bakteri ve mantar enfeksiyonları nedeniyle düşük olmasıdır. Melek balıklarının döllenmemiş veya mantarlaştıran yumurtaları doğada anaç balıklar tarafından toplanmaktadır⁵. Ancak, ticari olarak düşünüldüğünde bu durum mümkün gözükmemektedir. Bunun nedeni 1) anaç balıkların yumurtaları ile aynı ortamda bırakıldıklarında yumurtaları



İletişim (Correspondence)



+90 286 2180018/1589



sevdanyilmaz@comu.edu.tr

yemeleri, 2) yumurtalara ve devamında larvalara baktıkları dönemde daha az beslenmeleri ve bundan dolayı tekrardan yumurta üretimlerinin gecikebilmesi, 3) yumurtaların üreme ortamında bırakıldığında daha düşük açılım göstermeleridir.

Genel olarak melek balıklarının yetiştiriciliğinde yumurtaların bulunduğu zemin üretim ortamından alınıp çeşitli kimyasallar ile yumurta açılım oranı arttırılmaktadır. Bu amaçla melek balığı yumurtalarında metilen mavisi, hidrojen peroksit, acriflavin ve chloramine-T önceki çalışmalarda kullanılmıştır^{6,7}. Günümüzde ise sentetik kimyasalların kullanımı yerine alternatif doğal kaynaklara yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Balık yetiştiriciliğinde de hormon, antibiyotik, vitamin ve diğer birçok kimyasala alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılabilirliği araştırılmaktadır⁸. Fakat balık yumurtalarında bitki özütlerinin kullanımına yönelik çalışma sayısı oldukça azdır. Daha önce kekik, ateş çiçeği, okaliptüs ve nane bitkilerinin esans yağları karışımları; alabalık⁹ ve hint bademi özütü; tilapia¹⁰ balıklarının yumurta açılımının artırılmasında ve mantar enfeksiyonlarının önlenmesinde kullanılmıştır. Ancak biberiye, civanperçemi ve sumak bitkilerinin melek balıklarının yumurta açılımına etkisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada potasyum permanganat, metilen mavisi, biberiye, civanperçemi ve sumak özütlerinin melek balığı yumurtalarının açılım oranına ve bakteri yükü üzerine etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Balık, Yumurta ve Deneme Ortamı

Çalışmada "Tri Colour" varyetesi melek anaçlarından (*Pterophyllum scalare*) elde edilen yumurtalar kullanılmıştır. Yumurta açılımı ve yumurta kalitesi üzerindeki fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik su koşulları, yem ve anaç balık gibi birçok parametrenin etkisinin en aza indirilmesi amacıyla aynı partinin yumurtalarında deneme yürütülmüştür. Kullanılan anaç balıklar ve yumurtalar 26±1°C, 400 µs iletkenlik, 6.7 pH suda ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyodunda tutulmuşlardır. Balıklar günde 2 defa Tetramin Flake Food (Tetra® Germany) marka ticari yemle beslenmişlerdir. Balıkların bulunduğu akvaryum sisteminde günlük %10 su değişimi yapılmıştır. Balıklar 45° açılı yatay bir zemine yumurtladıktan 1 saat sonra yumurtaları nazikçe sifonlanmıştır. Yumurtaların sifonlanmasından sonra oluşabilecek olası hasarın tespit edilmesi için bir pipet yardımıyla ışığa tutulan yumurtaların opaklaşmayan, dölleniş ve hasarsız olanları seçilmiştir. Sağlıklı yumurtalar içerisinden 390 tanesi tesadüfen 3 tekerrürlü olarak, her biri 0.5 litrelik olan 39 adet silindire konik deneme ortamlarına yerleştirilmişlerdir. Deneme boyunca yumurtaların havalandırılması hava matoru yardımıyla yapılmış ve hava hortumuna takılan cam pisetler kullanılmıştır. Melek yumur-

talrı su değişimine hassas olduklarından dolayı buldukları deneme ortamında su değişimi yapılmamıştır.

Bitki Özütlerinin Çıkarılması

Çalışmada kullanılan biberiye (*Rosmarinus officinalis*); Çanak kale, sumak (*Rhus coriaria*); Edirne ve civanperçemi (*Achillea millefolium*); Roiak (Kuzey Doğu Bulgaristan)'dan toplanmıştır. Kurutulup öğütülen bitkilerin özütleri sulu özüt çıkartma metodu modifiye edilerek elde edilmiştir¹¹. Bitkiler 5 g tartılıp 95 ml saf suda 1 saat süreyle oda sıcaklığında muhafaza edildikten sonra 10 dakika 50°C de bekletilip 2 dakika boyunca vortex ile karıştırılmışlardır. Bu karışımlar 0.45 mikronluk filtreden geçirilerek özütler elde edilmiştir.

Sentetik Kimyasalların ve Özütlerin Uygulanması

Yumurtalar deneme ortamına yerleştirildikten sonra sentetik kimyasallar ve doğal özütler bir defa olacak şekilde ilave edilmiştir. Yumurtalar açılıncaya kadar deneme ortamında yumurtalara uygulanmışlardır. Kontrol grubu (K) suyuna hiçbir uygulama yapılmamıştır. Metilen mavisi daha önce melek balıklarında yapılan bir çalışma referans alınarak⁶ 0.5 ppm (M5), potasyum permanganat 0.2 ppm (P2) ve 0.4 ppm (P4), biberiye (B1, B5, B10), sumak (S1, S5 ve S10) ve civanperçemi (C1, C5, C10) özütleri yumurtaların bulunduğu suya sırasıyla 1.000 ppm, 5.000 ppm, 10.000 ppm olacak şekilde uygulanmışlardır.

Yumurta Açılımı

Melek balığı yumurtaları 3. günün sonunda açılmıştır. Zeminde sağlıklı bir şekilde hareket eden besin keseli larvaların, açılmamış yumurtaların ve ölü larvaların sayımları yapılarak her bir grup için yüzde açılım oranları formül yardımıyla hesaplanmıştır¹².

Mikrobiyal Yükün Tespit Edilmesi

Yumurtaların açıldığı 3. günün sonunda her bir grubun mikrobiyal yükünü tespit etmek için alınan su örnekleri gerekli seyreltmeler (10⁻⁵ ve 10⁻⁶) yapıldıktan sonra 3 gün Tryptic Soy Agar (TSA) ortamında³ 26±1°C derecede inkübe edilmiştir. Bakteri yükünün tespitinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{cfu/ml} = \text{Katı besiyerindeki koloni miktarı} \div 10^{-X} (\text{seyretme miktarı})$$

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için SPSS 17 paket programı kullanılmıştır. Yüzde açılım verilerine arcsin dönüşümü uygulandıktan sonra varyans analizi yapılmış ve ortalamalar Tukey testi ve açılımı değiştirme oranları Dunnett t-testi ile %5 önem düzeyinde karşılaştırılmıştır¹³.

BULGULAR

Çalışmada farklı deneme ortamlarının kontrol grubuna

göre yumurta açılımı üzerine arttırıcı veya azaltıcı etkileri (Tablo 1) ve melek balığı yumurta açılım oranları (Şekil 1) tespit edilmiştir. Kontrol grubunda açılım 50% bulunurken bu oranı M5: %20, P2: %23.33, B1: %20, B5: %26.67, B10: %30 ve C5: %16.67 arttırmıştır ($P<0.05$). C1 (-%8.33), C10 (%3.33) ve S1 (-%13.33) grupları kontrol grubuyla benzer bulunmuştur ($P>0.05$). P4 (-%33.33), S5 (-%30) ve S10 (-%50) grupları ise yumurta açılımını azaltmıştır ($P<0.05$).

Çalışmada toplam bakteri en fazla kontrol grubunda tespit edilmiştir (Şekil 2). M5, P2 ve P4 grupları bakteri miktarını azaltmıştır ($P<0.05$). Bitki özütlerinden biberiye, civanperçemi ve sumak uygulamalarının tamamı bakteri yükünü azaltmıştır ($P<0.05$). B5, B10, C5 ve C10 grupları bakteri miktarı üzerinde birbirleriyle benzer etki göstermiştir ($P>0.05$).

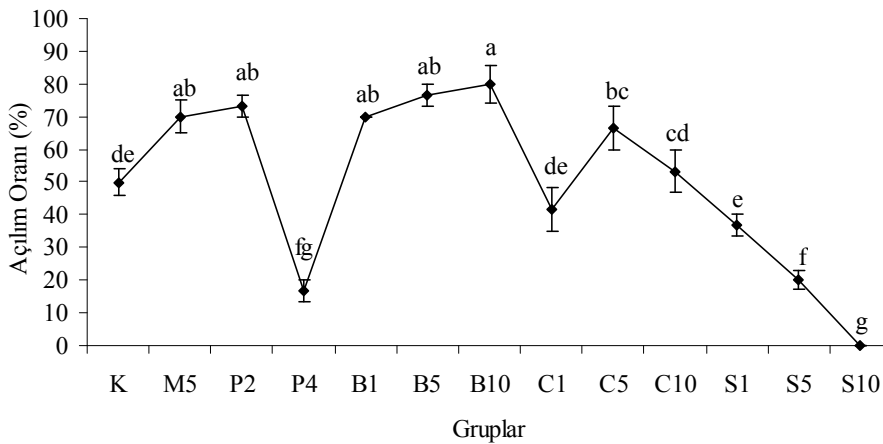
TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada melek balığı yumurtalarının bulunduğu ortama ilave edilen bitki özütlerinin ve sentetik kimyasalların bakteri yükü ve yumurta açılımı üzerinde etkili oldukları tespit edilmiştir.

Sentetik kimyasallardan metilen mavisinin melek balığı yumurtalarında açılım oranını önemli miktarda arttırdığı (Şekil 1) ve bakteri yükünü azalttığı (Şekil 2) bulunmuştur. Benzer olarak melek balıklarında 0, 0.5, 2.5 ve 5 ppm metilen mavisi uygulamaları arasında en yüksek açılımı 0.5 ppm sağlamış (%63.3), ancak gruplar arasında fark tespit edilememiştir⁶. Melek balıklarında yapılan başka bir çalışmada ise metilen mavisi, hidrojen peroksit, acriflavin ve chloramine-T uygulamaları yumurta açılımına etki etmemiştir⁷. Melek balıklarında yapılan çalışmalarda kimyasal

Deneme Grupları	Konsantrasyon (ppm)	Açılımı Değiştirme Oranı (%)	P
Kontrol	0	---	
Metilen Mavisi	0.5	+20.00*	0.038
P. permanganat	0.2	+23.33*	0.011
	0.4	-33.33*	0.000
Biberiye	1000	+20.00*	0.038
	5000	+26.67*	0.003
	10.000	+30.00*	0.001
Civanperçemi	1000	-8.33	0.795
	5000	+16.67*	0.043
	10.000	+3.33	1.000
Sumak	1000	-13.33	0.295
	5000	-30.00*	0.001
	10.000	-50.00*	0.000

* Dunett t-testi sonuçlarına göre kontrol grubundan istatistiksel açıdan farklı olan grupları göstermektedir

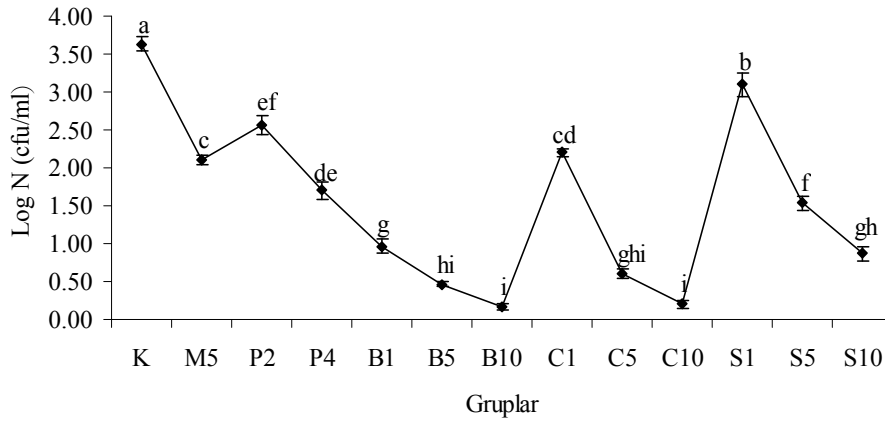


Şekil 1. Deneme gruplarının yumurta açılımlarına etkisi

Fig 1. The effects of treatment groups on egg hatching rates

Her bir deneme grubu ortalama \pm standart hatayı temsil etmektedir (n=3)

Farklı harfleri içeren gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$)



Şekil 2. Deneme gruplarının yumurta suyundaki bakteri yüküne etki

Fig 2. The effects of treatment groups on bacterial loads in egg water

Her bir deneme grubu ortalama \pm standart hatayı temsil etmektedir (n=3)

Farklı harfleri içeren gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05)

uygulaması yapılmayan gruplarda dahi açılım oranının %14 ile %84 arasında değişim göstermesinin ⁷ nedeni, farklı partilerin yumurtalarının kullanılmasıyla açıklanabilir. Bu çalışmadaki melek balıklarında aynı parti yumurtaların kullanılması daha standart veriler elde edilmesini sağlamış olabilir.

Melek balıklarında potasyum permanganatın (P2), metilen mavisine (M5) benzer olarak yumurta açılımını arttırdığı (Şekil 1), ancak bakteri yükünü daha düşük oranda azalttığı (Şekil 2) tespit edilmiştir. Melek balığı yumurtalarının açılımı potasyum permanganatın 0.2 ppm uygulamasında %23.33 artmıştır (Tablo 1). Afrika kedibalığı (*Clarias gariepinus*)'nda yapılan farklı bir çalışmada ise potasyum permanganat 2 ppm dozunda yumurta açılımını %37.8'den %85.6'a çıkarmıştır ¹⁴. Kedibalığında potasyum permanganat daha yüksek konsantrasyon da kullanılmakla birlikte uygulamalar kısa süreli banyolar şeklinde yapılmıştır. Bu çalışmada ise potasyum permanganat düşük dozda uzun süre (3 gün) uygulanmış ve benzer olarak yumurta açılımının artmasını sağlamıştır. Ancak, artan oranda yumurta açılımını yaklaşık %33 oranında azaltmıştır (Tablo 1). Bunun nedeni yüksek oranda potasyum permanganatın yumurtalarda öldürücü etki yapmasıyla açıklanabilir. Permanganatın farklı balık ve kabuklu türlerinin yumurta ve larvaları üzerinde öldürücü etkisi ¹⁵ bu sonucu desteklemektedir.

Bu çalışmada suya uygulanan doğal ve sentetik ürünlerin antimikrobiyal etkileri sayesinde mikrobiyal yükü azalttığı düşünülmektedir. Ayrıca toplam bakteri miktarı bakımından kimyasal ve bitkisel kaynakların etkilerine bakıldığında tüm grupların bakteri miktarını azalttıkları bulunmuştur (Şekil 2). Ancak sumanın tüm dozajlarında yumurta açılımının daha az olduğu görülmektedir (Şekil 1). Bunun nedeni sumanın potasyum permanganatta olduğu gibi yumurtalar üzerinde toksik etki göstermesiyle açıklanabilir. Benzer olarak farklı çalışmalarda kullanılan çeşitli sentetik kimyasalların kullanım konsantrasyonu arttıkça bakteri miktarı azalmış, ancak yumurta açılım oranı düşük bulunmuştur ^{7,16,17}. Tıbbi bitkilerin sentetik kimyasallar gibi yüksek miktarda toksik etki göstermeleri içerdikleri

komponentlerden kaynaklanabilir. Bu durumda yüksek miktarlarda uygulandıklarında yumurtaları öldürdükleri söylenebilir.

Bu çalışmada deneme grupları arasında bakteri miktarının düşürülmesinde en etkili uygulamanın biberiye olduğu tespit edilmiştir. Melek balıklarında elde edilen bulgulara benzer olarak alabalıklarda enfekte yumurta miktarı farklı bitkilerin esans yağ karışımıyla azaltılmıştır ⁹. Yapılan çalışmalarda metilen mavisi ¹⁸, potasyum permanganat ¹⁹, biberiye ²⁰, sumak ¹¹ ve civanperçeminin ²¹ antimikrobiyal ve antifungal etkileri bildirilmiştir. Bu etkileriyle sudaki bakteri yükünü azalttıkları ve dolayısıyla yumurta açılımında arttırdıkları düşünülmektedir. Benzer olarak çalışmalarda mikrobiyal yükün azalması yumurta açılımını arttırmıştır ^{3,16,22}. Ancak bazı araştırmacılar mikrobiyal yük ile yumurta açılımının artması arasında önemli bir ilişki olmadığını bildirmemişlerdir ^{12,23,24}. Elde edilen farklı sonuçlar yumurtalar üzerinde kullanılan kimyasalların dozajının uygun olmaması, mikrobiyal yük dışında çevresel faktörler, beçler arasındaki farklılıklar, yumurta kalitesindeki değişimler, mantar, virus, parazit gibi etkenler ve tümünün birlikte etkileriyle açıklanabilir.

Çalışma sonunda biberiye özütünün 1.000 ppm, 5.000 ppm ve 10.000 ppm uygulamaları, yumurta açılımını benzer oranda arttırmıştır. Bu nedenle 1.000 ppm biberiye özütünün melek balıklarında kontrole göre yeterli yumurta açılımını sağladığı, potasyum permanganat ve metilen mavisi yerine kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. İleriki çalışmalarda sumanın daha düşük dozları ve civanperçeminin ara dozları denenebilir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan kaynakların teminindeki katkılarından dolayı Sayın Dr. Özcan ÖZEN'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Wagner EJ, Arndt RE, Billman EJ, Forest A, Cavender W: Comparison of the efficacy of iodine, formalin, salt, and hydrogen peroxide for control

- of external bacteria on rainbow trout eggs. *N Am J Aquacult*, 70 (2): 118-127, 2008.
- 2. Straus DL, Mitchell AJ, Radomski AA, Carter RR:** Laboratory dose confirmation of copper sulfate for treating fungus on channel catfish eggs. *N Am J Aquacult*, 71 (4): 333-338, 2009.
- 3. Can E, Saka Ş, Fırat K:** Disinfection of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), red porgy (*Pagrus pagrus*), and common dentex (*Dentex dentex*) eggs from sparidae with different disinfectants. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2): 299-306, 2010.
- 4. Yılmaz M, Mutaf BF, İkiz R:** Melek Balıklarında (*Pterophyllum scalare* Lichtenstein, 1823) birinci döl bireylerinde renk-desen açılımının izlenmesi ile ebeveyn genotiplerinin belirlenmesi. *Turk J Fish Aquat Sci*, 23 (1-2): 173-176, 2006.
- 5. Swann L:** Reproduction of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Illinois-Indiana Sea Grant Program Fact Sheet, *Soyink*, AS-489: 6 pp, 1993.
- 6. Perlberg ST, Diamant A, Ofir R, Zilberg D:** Characterization of swim bladder non-inflation (SBN) in angelfish, *Pterophyllum scalare* (Schultz), and the effect of exposure to methylene blue. *J Fish Dis*, 31 (3): 215-228, 2008.
- 7. Sanabria C, Diamant A, Zilberg D:** Effects of commonly used disinfectants and temperature on swim bladder non-inflation in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein). *Aquaculture*, 292 (3-4): 158-165, 2009.
- 8. Citarasu T:** Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int*, 18 (3): 403-414, 2010.
- 9. Mousavi SM, Mirzargar SS, Mousavi HEZ, Baigi RO, Khosravi A, Bahonar A, Ahmadi MR:** Evaluation of antifungal activity of new combined essential oils in comparison with malachite green on hatching rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Turk J Fish Aquat Sci*, 4 (2): 103-110, 2009.
- 10. Chitmanat C, Tongdonmuan K, Khanom P, Pachontis P, Nunsong W:** Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. *Songklanakarın J Sci Technol*, 27 (Suppl.1): 359-364, 2005.
- 11. Nasar-Abbas SM, Halkman AK:** Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int J Food Microbiol*, 97 (1): 63-69, 2004.
- 12. Komar C, Turnbull JF, Roque A, Fajer E, Duncan NJ:** Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture*, 229 (1-4): 147-158, 2004.
- 13. Logan M:** Single factor classification (ANOVA). In, Logan M (Ed): *Biostatistical Design and Analysis Using r: A Practical Guide*. 1st ed., pp. 254-282, Wiley-Blackwell, London, 2010.
- 14. Rasowo J, Okoth OE, Ngugi CC:** Effects of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. *Aquaculture*, 269 (1-4): 271-277, 2007.
- 15. Melendre PM, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, Aguilera A:** Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae). *Aquaculture*, 257 (1-4): 257-265, 2006.
- 16. Treasurera JW, Cochrane E, Grant A:** Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. *Aquaculture*, 250 (1-2): 27-35, 2005.
- 17. Mitchell AJ, Radomski AA, Straus DL, Carter R:** The effect of hydrogen peroxide on the hatch rate and *Saprolegnia* spp. infestation of channel catfish eggs. *N Am J Aquacult*, 71 (3): 276-280, 2009.
- 18. Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N, Kimura E:** Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosciences*, 33 (2): 231-237, 2008.
- 19. Wakabayashi H:** Effects of environmental conditions on the infectivity of *Flexibacter columnaris* to fish. *J Fish Dis*, 14(3): 279-290, 1991.
- 20. Baratta MT, Dorman JD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G:** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Frag J*, 13 (4): 235-244, 1998.
- 21. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T:** Screening of some siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 82 (1): 51-53, 2002.
- 22. Holcomb M, Cloud JG, Ingermann RL:** Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquac Res*, 36 (15): 1555-1561, 2005.
- 23. Tendencia EA:** Bacterial microbiota of eggs from cage-reared and tank-reared grouper, *Epinephelus coioides*. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 24 (3): 161-165, 2004.
- 24. Miguez B, Combarro MP, Guisande C, Vergara AR, Riveiro I:** Effect of bacterial epiflora on egg hatching of the Atlantic sardine (*Sardina pilchardus*). *FEMS Microbiol Ecol*, 50 (2): 111-115, 2004.