

Balıklardan İzole Edilen Bakteriyel Patojenlere Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağlarının Antibakteriyal Aktivitesi

Seçil EKİCİ *  Öznur DİLER * Behire Işıl DİDİNEN * Ayşegül KUBİLAY *

* Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, TR-32500 Eğirdir, Isparta - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3224

Özet

Bu araştırmada, kekik (*Origanum vulgare*), melisa (*Melissa oleum*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) bitkisel uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri ve balıklardan izole edilen bakteriyel patojenlerden; *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *Lactococcus garvieae* üzerinde *in vitro* ortamda antibakteriyal etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan kekik ve melisa uçucu yağlarının diğer bitkisel yağlara oranla daha güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği ve kekik yağının spektrumu geniş bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Antibakteriyal aktivite, Bakteriyel balık patojenleri, Tıbbi bitkiler, Uçucu yağ, Agar diffüzyon, Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)

Antibacterial Activity of Essential Oils From Medicinal Plants Against Bacterial Fish Pathogens

Summary

In this work, essential oils of thyme (*Origanum vulgare*), melissa (*Melissa oleum*), lavender oil (*Lavandulae romanae oleum*), rosemary oil (*Rosmarinus officinalis*), ginger (*Zingiber officinale*) were screened for their chemical composition and *in vitro* antibacterial activity against *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Lactococcus garvieae*. In this study, thyme (*Origanum vulgare*), melissa (*Melissa oleum*) essential oils showed a stronger antimicrobial effect compared to other plant oils. The broadest spectrum of antibacterial activity was attained with oil of thyme (*Origanum vulgare*).

Keywords: Antibacterial activity, Bacterial fish pathogens, Medicinal plants, Essential oil, Agar diffusion, Minimal inhibitory concentration (MIC)

GİRİŞ

İntensif balık yetiştiriciliğinde artan üretime paralel olarak hastalık problemleri sıklıkla yaşanmaktadır. Yüksek stoklama yoğunluğu, bakteriyel hastalıkların yaygın olarak görülmesine neden olmakta ve eğer tedavi yapılmazsa, balık ölümlerinden ve büyümenin yavaşlamasından dolayı büyük ekonomik kayıplar olabilmektedir. Bu nedenle balık yetiştiriciliğinde hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önemlidir¹⁻³.

Ülkemiz su ürünleri üretiminde ekonomik bakımdan önemli bir tür olan gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliğinde epizootilere neden olan bakteriyel etkenler izole edilmiştir.

Ülkemizde gökkuşuğu alabalığı üretiminde en sık görülen bakteriyel patojenler; *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* ve *Flavobacterium psychrophilum*'dur⁴⁻¹³.

Akuakültürde antimikrobiyal maddeler, infeksiyöz etkenlerin neden olduğu balık hastalıklarının önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁴.

Balık hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal maddelerin bilinçsiz kullanımının çevre, balık ve insan sağlığı açısından bir çok olumsuz etkiye neden olduğu bilinmektedir¹⁴⁻¹⁶. Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammad-



İletişim (Correspondence)



+90 246 3133447



secil_ekici@yahoo.com

deleri, tedavilerde kullanılan ilaçların büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçlar ve terapotik maddelerin yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması, infeksiyöz etkenlerin tedavisi için kullanılacak doğal, güvenilir ve ucuz ürünlerin kullanılma zorunluluğunu arttırmıştır^{17,18}. Bu nedenle akuakültürde balık patojenleri ile mücadelede bitkisel ürünlerin kullanımı alternatif ve güncel uygulamalardır.

Akuakültürde balık hastalıklarının kontrolünde özellikle bitkilerden elde edilen doğal maddelerin kullanımına dikkat çekilmektedir¹⁹. Citarasu ve ark.²⁰ kaplan karides (*Penaeus monodon*) larvalarında belirgin bir şekilde yaşama oranını artıran bitkisel ürünlerin antimikrobiyal ve antistres etkilerini tanımlamışlardır. Babu ve Marian²¹ *P. monodon* larvalarının bitkisel kökenli ilaçlarla beslendiğinde hastalıklara karşı bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilerini rapor etmişlerdir.

Bansemir ve ark.²² Rhodophyceae familyasına ait *Asparagopsis armata*, *Ceramium rubrum*, *Drachiella minuta*, *Falcnbergia rufolamosa*, *Gracillaria cornea* ve *Halopitys incurvus*'ün tohumlarının *V. anguillarum*, *P. angulliseptica*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri*'ye karşı en etkili türler olduğunu ve çalışmada kullanılan tohum ekstraktlarına ait MİK değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılan oksitetrasiklinden çok daha yüksek olduğunu (bu ekstraktların pek çok bileşiğin kompleks bir karışımı olması nedeniyle) kaydetmişlerdir. Marques ve ark.²³ sarımsak, kekik ve kitosanın gıda kaynaklı *Salmonella enterica*'ya karşı *in vitro*'da antimikrobiyal aktivitelerini inceledikleri çalışmada kekiğin en güçlü antibakteriyel özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada kekik, melisa, karabaş, biberiye ve zencefil bitki ekstraktlarından hazırlanmış olan ticari bitkisel uçucu yağların balık patojeni bakterilerden *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garvieae*, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio alginolyticus*'a ait toplam 9 suşa karşı antibakteriyel etkisinin *in vitro* olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bitkisel Yağlar

Çalışmamızda kekik (*Origanum vulgare*), melisa (*Melissa oleum*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), zencefil (*Zingiber officinale*) bitkilerinin ticari yağları kullanılmıştır. Bitkisel yağların uçucu yağ örneklerinin kimyasal bileşimleri SDÜ Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinde GC (Gaz Kromatografi) ve MS (Kütle Spektrometresi) cihazları kullanılarak belirlenmiştir.

GC-MS Analizi

GC-MS analizleri QP 5050 mass selektif dedektörden

oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Analizler Sonsuzer Hancı ve ark.²⁴ ve Azaz ve ark.'na²⁵ göre modifiye edilerek yapılmıştır. GS-MS analizleri QP 5050 mass selektif dedektörden oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Uçucu yağ örnekleri Cp WAX 52 CB kapillar kolondan geçirilmiştir (50 m x 0.32 mm x 1.2 µm). Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmıştır. Akış hızı 10 psi olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 60°C olup, 220°C'ye dakikada 2°C'lik artışla ulaşmıştır. 220°C'de 20 dak. süreyle sabit tutulmuştur. Bileşenler kolonda kalma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada Wiley, Nist, Tutor kütüphaneleri çıkan spektrumların otomatik taranması ile analizler gerçekleştirilmiştir^{24,25}.

Kullanılan Bakteriyel Balık Patojenleri

Araştırmada hasta balıklardan izole edilmiş olan *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* ve *Lactococcus garviae* suşları kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan bakteriyel balık patojenleri ve kökenleri *Tablo 1*'de verilmiştir.

Tablo 1. Bakteri türleri ve kökenleri

Table 1. Bacteria species and origin

No	Bakteri Türü	Köken
1	<i>Yersinia ruckeri</i>	Alabalık-Denizli
2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Alabalık-Isparta
3	<i>Lactococcus garviae</i>	Alabalık-Fethiye
4	<i>Lactococcus garviae</i>	Alabalık-Fethiye
5	<i>Vibrio anguillarum</i>	Levrek- Muğla
6	<i>Vibrio anguillarum</i>	Alabalık-Fethiye
7	<i>Vibrio anguillarum</i>	Alabalık-Fethiye
8	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Levrek-Muğla
9	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Alabalık-Muğla

Antibakteriyel Aktivitenin Tespiti

Bitkisel yağların antibakteriyel etkileri agar diffüzyon metodu ile saptanmıştır²⁶. Bitkisel yağlar %1, %2.5, %5, %7.5 ve %10 oranlarında metanolde homojenize edilmiştir²⁷. Antibakteriyel etkinin belirlenmesinde, *Y. ruckeri*, *A. hydrophila*, *L. garviae* suşları için triptic soy agar (TSA), *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları için %2 tuz ilavesi yapılmış TSA, *F. psychrophilum* için anacker-ordal agar hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri döküm sıcaklığına geldiğinde, Mc Farland 0.5'e ayarlanan bakteri süspansiyonunun (10⁸ cfu/ml)'dan 100 ml besiyerine 100 µl eklenerek döküm yapılmıştır. Dökümden 15-20 dak. sonra besiyerleri üzerinde 3 mm çapında çukurlar açılmış ve bu çukurlara her bitkinin farklı konsantrasyonda metanolle hazırlanmış solüsyonlarından 25 µl ilave edilmiştir. Kontrol olarak bir çukura ise sadece metanol eklenmiştir. Her bir örnek iki paralel olarak çalışılmış ve değerlerin ortalaması

alınmıştır. *F. psychrophilum* 18°C'de 48 saat, diğer bakteriler ise 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür²⁶.

Mikrodilüsyon Metodu

Bitkisel yağların minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) mikro dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. MİK değerlerinin belirlenmesinde, *Y.ruckeri* ve *L. garvieae* suşları için muller hinton broth (MHB), *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları için %2 tuz ilavesi yapılmış MHB ve *F. psychrophilum* için anacker-ordal broth hazırlanarak bakteriler ekilmiştir²⁸. *F. psychrophilum* 18°C'de 48 saat, diğer bakteriler 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra yoğunlukları, Mc Farland 0.5'e ayarlanmıştır. Daha sonra metanol içerisinde 1.000 µl/ml olacak şekilde çalışma stoğu oluşturulmuştur. Hazırlanan stoktan, metanol aynı konsantrasyonda olmak kaydıyla, sürekli yarıya düşürülerek (500, 250, 125, 62.6, 31.25, 15.62, 7.8, 3.9, 1.95, 0.97, 0.48, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03, 0.01 µl/ml) steril tüplerde her bir değer için bağımsız olarak çalışma stokları hazırlanmıştır²⁹. MİK okumasının gerçekleştirilmesinde, 96 çukurlu plakların her çukuruna çalışma stoklarından 100 µL eklenmiştir. Üzerine 100 µL MHB'da üretilmiş mikroorganizma inokulumu (0.5 Mc Farland standardına eşdeğer kültürden) eklenip ve toplam hacim çukur başına 200 µl'ye tamamlanmıştır²⁹.

Bakteri inokulumu ve çalışma stokları pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra mikropate 20°C de 24 ile 48 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnek için, iki ayrı bağımsız set düzenlenerek değerlerin ortalaması alınmıştır. Kontrol olarak eşit hacimde metanol ve MHB karıştırılarak kullanılmıştır²⁹.

Mikrobiyal büyüme mikropate üzerinde ELISA okuyucusu (BIORAD) yardımıyla 630 nm'de absorban değerleri kontrole karşı okunarak belirlenmiştir. MİK değeri mikroorganizmaların büyümenin olmadığı en düşük madde konsantrasyonu olarak alınmıştır³⁰.

BULGULAR

GC-MS Analiz Sonuçları

Kekik (*Origanum vulgare*), melisa (*Melissa oleum*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve zencefil (*Zingiber officinale*)'e ait uçucu yağ bileşenleri tanımlanmıştır. Belirtilen bitkilerden elde edilen en dikkat çeken uçucu yağ bileşenleri kekikte carvacrol %82.02, melisa'da isopropyl myristate %34.81, biberiye'de 1.8-cineole %30.95, karabaş yağında isopropyl myristate %92.72 ve zencefil'de heneicosane %35.05 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

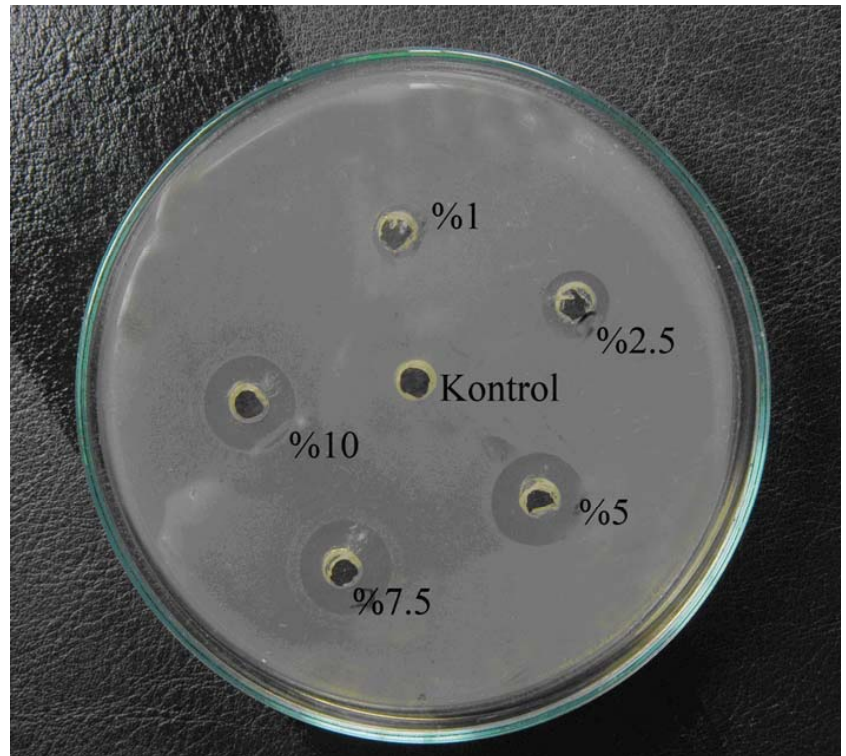
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

- Agar Diffüzyon Testi Sonuçları

Bu çalışmada kullanılan 5 farklı (kekik, melisa, karabaş, biberiye, zencefil) bitkisel yağdan kekik yağının metanol ile homojenize edilerek hazırlanan %1, 2.5, 5, 7.5 ve 10'luk farklı konsantrasyonlarının her biri *F. psychrophilum*'a karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Kekik yağı özellikle *F. psychrophilum*'a karşı oldukça büyük bir inhibisyon zonu (40 mm) oluşturmuştur. Kekik yağı balık patojeni suşlar arasından *L. garvieae*'e karşı diğer patojen suşlara göre daha az etkili olmuştur (Tablo 3). Kekik yağının *V. anguillarum*'a

Şekil 1. *Origanum vulgare* yağının *Y. ruckeri*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları

Fig 1. Inhibition zones of *Origanum vulgare* oils against *Y. ruckeri*



Tablo 2. Yağlara ait GC-MS sonuçları**Table 2.** GC-MS results of essential oils

Bitkisel Yağlar	Tanımlanan Kimyasalın Referans Adı	Oran, %
Kekik (<i>Origanum vulgare</i>)	Alpha-pinene (8.5)	1.91
	Tymol (20.8)	9.73
	Terpineol (33.2)	1.36
	Caryophyllene (42.1)	1.91
	Borneol (48.3)	3.07
	Carvacrol (76.0)	82.02
Melisa (<i>Melissa oleum</i>)	Alpha-pinene (8.5)	1.29
	1,4 Cineole (15.4)	2.03
	Limonene (16.6)	27.75
	1,8-cineole (17.2)	1.53
	Terpinolene (21.5)	3.13
	Glycol	25.86
	Isopropyl Myristate (66.8)	34.81
Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Alpha-pinene (8.5)	1.69
	Myrcene (15.4)	1.13
	Limonene (16.6)	30.51
	1,8-cineole (17.2)	30.95
	Cymole (20.7)	0.62
	Gamma-terpinene (21.5)	2.87
	Camphor (37.2)	0.89
	Propylen Glycol	30.71
Karabaş (<i>Lavandulae romanae oleum</i>)	Alpha-pinene (8.5)	0.16
	Fenchone (16.6)	0.71
	1,8-cineole (17.2)	2.10
	Naphthalene, decahydro-2-methyl (37.3)	2.33
	Bornyl acetate (42.0)	0.68
	Isopropyl Myristate (66.8)	92.72
	Propylen Glycol	0.70
Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)	2-acetonyl cylohexanone (17.2)	3.02
	2-hekzanol (41.2)	2.68
	2,5-dimethyl undecane (47.0)	1.49
	Zingiberene (49.2)	2.90
	Cuparene (52.3)	4.50
	Trimethyl methylene cylopropane (55.2)	2.93
	Nonadecane	31.54
	9-nonadecene	9.78
	Eicosane	4.51
	Heneicosane	35.05

%5, 7.5 ve 10, *V. alginolyticus* için %5 ve 10, *Y.ruckeri* için %7.5 ve 10, *L. garvieae* için %10, *A. hydrophila* için %5, 7.5 ve 10'luk konsantrasyonlarının antibakteriyel etkisi olduğu görülmüştür (Şekil 1).

Melisa yağının çalışmada kullanılan bakterilerden *L. garvieae* dışındaki diğer balık patojenleri için antibakteriyel etkisi olduğu görülmüştür. *F. psychrophilum*'a %7.5 ve 10, *V. anguillarum*'a %5, 7.5 ve 10, *V. alginolyticus*'a %7.5 ve 10, *Y. ruckeri*'ye %10 ve *Aeromonas hydrophila*'ya karşı %7.5 ve 10 konsantrasyonda antibakteriyel etkisi belirlenmiştir (Tablo 3).

Diğer bitkisel yağlardan karabaş, biberiye, zencefilin bakteriyel patojen bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisi görülmemiştir.

- Mikrodilüsyon Sonuçları

Bu çalışmada kekik (*Origanum vulgare*) ve melisa (*Melissa oleum*) yağları ile yapılan mikrodilüsyon testinde 16 farklı konsantrasyon denenmiştir.

Kekik yağının *V. anguillarum* suşları üzerine etki değeri *V. anguillarum* 1 suşunda 125 µl/ml olurken *V. anguillarum*

Tablo 3. Kekik ve melisa yağlarının farklı bakteriyel balık patojenlerine karşı antibakteriyal aktivite (inhibisyon zon çapı, mm)**Table 3.** Antimicrobial activity of *Origanum vulgare* and *Melissa oleum* oils against different bacterial fish pathogens (The diameter of the zone of inhibition, mm)

Bakteri Türü	Kekik (<i>Origanum vulgare</i>) (%)					Melisa (<i>Melissa oleum</i>) (%)				
	1	2.5	5	7.5	10	1	2.5	5	7.5	10
<i>F. psychrophilum</i>	40±0 (K)	40±0 (K)	40±0 (K)	40±0 (K)	40±0 (K)	-	-	7±0 (Z)	8±0.5 (O)	8±0 (O)
<i>V. anguillarum 1</i>	8.5±0.5 (O)	15.75±1.74 (K)	24.5±3.5 (K)	32.5±5.5 (K)	28.5±3.5 (K)	7±0 (Z)	8.5±0.5 (O)	8±1 (O)	8.5±0.5 (O)	11±2 (O)
<i>V. anguillarum 2</i>	10±0 (O)	14.5±1.5 (O)	23±4 (K)	23±1 (K)	31±5 (K)	10±1 (O)	8.5±0.5 (O)	9.5±1.5 (O)	9±0 (O)	9±1 (O)
<i>V. anguillarum 3</i>	8±0 (O)	9.5±0.5 (O)	16±1 (K)	20±1 (K)	21.5±1.5 (K)	7.5±0.5 (Z)	8.5±0.5 (O)	9±1 (O)	9.25±0.12 (O)	8.5±0.5 (O)
<i>V. alginolyticus</i>	8±0 (O)	11±0 (O)	14.5±0.5 (O)	13.5±0.5 (O)	15±1 (O)	9.5±0.5 (O)	8.5±0.5 (O)	9±1 (O)	13±0 (O)	10±0 (O)
<i>Y. ruckeri</i>	8±0 (O)	11±1 (O)	13.5±1.5 (O)	16.5±0.5 (K)	17.5±0.5 (K)	-	6.5±0.5 (Z)	7.5±0.5 (Z)	8±0 (O)	9±0 (O)
<i>L. garviae 1</i>	6±0 (Z)	8±0 (O)	8.5±0.5 (O)	9.75±1.74 (O)	10±1 (O)	-	-	-	-	-
<i>L. garviae 2</i>	7.75±0.74 (Z)	9±1 (O)	9±0 (O)	9.25±0.24 (O)	9±0 (O)	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	6.5±0.5 (Z)	11±0 (O)	16.75±0.24 (K)	21.5±0.5 (K)	23.5±0.5 (K)	-	-	8.5±0.5 (O)	9±0 (O)	8.5±0.5 (O)

-: Antibakteriyal etki saptanmadı, K: Kuvvetli, O: Orta, Z: Zayıf

2 ve 3 nolu suşlarında 31.25 µl/ml olarak belirlenmiştir. *V. alginolyticus* ve *Yersinia ruckeri* için 125 µl/ml, *Lactococcus garviae*'nin her iki suşu için 62.5 µl/ml olarak tespit edilmiştir. Kekik yağının en etkili olduğu bakteri olan *F. psychrophilum*'a 7.8 µl/ml dozda etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4).

Melisa yağı *F. psychrophilum* ve *V. anguillarum* suşları üzerine etki değeri 62.5 µl/ml olurken *V. alginolyticus* için 250 µl/ml, *Yersinia ruckeri* için 125 µl/ml olarak tespit edilmiştir. Melisa yağının *Lactococcus garviae*'nin her iki suşu için etkisiz olduğu görülmüştür (Tablo 5).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada, tıbbi özellikleri bilinen kekik, melisa, karabaş, biberiye ve zencefil bitkilerinin³¹ içerdikleri uçucu yağların oranları tespit edilerek bazı balık patojenleri üzerine antibakteriyal etkileri agar diffüzyon metodu ve mikrodilüsyon testi ile belirlenmiştir.

Genel olarak, bitki tür veya alt türlerinin esansiyel/uçucu yağ içerikleri bakımından önemli derecede farklılıklara sahip oldukları bildirilmektedir. Bu farklılıklar üzerine ör-

neklerin alındığı coğrafik bölgeler, iklimsel farklılıkları, top-
rak koşullarındaki farklılıkları, farklı orijinlerden gelmeleri veya vejetasyon döngülerinin etkili olduğu belirtilmektedir³¹⁻³³. Kekik ile yapılan çalışmalarda, kimyasal içerik analizlerine göre ağırlıklı bileşiklerin tymol ve carvacrol olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kekik uçucu yağ bileşenlerinin GS-MS analizi sonucunda toplamda 6 farklı bileşen içerdiği saptanmıştır. Bu kimyasallar içerisinde carvacrol %82.02 ve tymol %9.73 tarafından ağırlıklı olarak temsil edildiği anlaşılmıştır.

Türkiye'nin farklı yörelerinden elde edilen Melisa yağının uçucu yağ oranını %0.010-0.097 arasında değiştiğini ve uçucu yağ bileşenlerinin α-pinen, β-pinen, linalool, citronellal, borneol, neral, geraniol ve geranial olduğu belirlenmiştir. Melisa yağının uçucu yağ bileşenlerinin lokasyonlara göre değişmekle birlikte Türkiye kökenli oğul otunda β-pinen oranının yüksek olduğunu, uçucu yağda neral + geranial oranının %70 civarında olduğunu tespit etmişlerdir³⁴. Bu çalışmada GS-MS analizi sonucunda melisa yağında toplamda 7 farklı bileşik içerdiği saptanmıştır. Bu kimyasallar içerisinde isopropyl myristate %34.81 ve limonene %27.75'nin yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Diğer araştırmacıların belirttiği melisa yağının uçu-

cu yağ bileşenlerindeki değişimler toprak, iklim koşulları, bitki gelişme dönemleri, bitkinin yaşı, hasat ve bitki depolama koşullarını da içeren iç ve dış faktörlere bağlıdır^{35,36}. Bu nedenle melisa yağındaki uçucu yağ bileşenlerinde yapılan diğer çalışmalara göre farklılıklar olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlara göre; kekik, melisa, karabaş, biberiye, zencefil; melisa ve kekik yağının *Y. ruckeri*, *A. hydrophila*, *V. anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *F. psychrophilum* bakteriyel balık patojenleri üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bansemir ve ark.'na²² göre değerlendirme yapıldığında %5, 7.5 ve 10 konsantrasyonlardaki kekiğin *F. psychrophilum*, *V. anguillarum*, *Y. ruckeri*, *A. hydrophila*, bakteriyel balık patojenleri üzerine kuvvetli bir aktivite, *L. garvieae* ve *V. alginolyticus* bakterilerine karşı orta bir antibakteriyal aktivite tespit edilmiştir. Melisa yağı, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum*, *Y. ruckeri*, *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, bakteriyel balık patojenleri üzerine orta derecede bir antimikrobiyal aktivite gösterirken *L. garvieae* patojenine karşı antimikrobiyal aktivite göstermemektedir. Melisa yağı ile yapılan mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinde *F. psychrophilum* ve *V. anguillarum* suşları üzerine etki değeri 62.5 µl/ml olurken *V. alginolyticus* için 250 µl/ml, *Yersinia ruckeri* için 125 µl/ml olarak tespit edildi. Melisa yağının *Lactococcus garviae*'nin her iki suşu için etkisiz olduğu görülmüştür. Ayrıca kekik yağı (*Origanum vulgare*'nin, mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinde; *F. psychrophilum* üzerine elde edilen etki değeri 7.8 µl/ml, diğer bakteriyel balık patojenlerine karşı elde edilen etki değeri ise 31.25 - 125 µl/ml olarak belirlenmiştir. Marques ve ark.²³ kekik (*Origanum vulgare* L.) bitkisinin flavonoidleri içermesinden dolayı iyi bir antioksidant ve tymol ve carvacrol içermesinden dolayı da iyi bir antimikrobiyal madde olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar kekiğin *Salmonella enterica* bakterisine karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini incelemiş ve güçlü bir antibakteriyal etki tespit etmişlerdir. Kekik ve diğer fitokimyasalların, kemoteröpotik ilaçlara alternatif olabileceğini gösteren araştırma bulgularımız diğer araştırmalardan elde edilen²³ bulguları desteklemektedir.

Al-Bayati³⁷ yapmış olduğu çalışmada, *Thymus vulgaris*'in metanol ekstraktının birçok patojene karşı olan antibakteriyal etkisini mikrodilüsyon yöntemi ile tespit etmiştir. Kekiğin, en güçlü antibakteriyal aktivite *Bacillus cereus*'da 15.6 µg/ml MİK değeri ile bulunurken, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus vulgaris*'te 31.2 µg/ml MİK değeri olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da kekiğin bakteriyel balık patojenlerine karşı MİK değeri 7.8-125 µl/ml arasında tespit edilmiş olup, Al-Bayati'nin³⁷ sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Antibiyotiklere alternatif olmak üzere bitkilerle tedavi uygulamaları, güvenilir ve yeni bir teknik olması yanısıra yakın gelecekte balık çiftlikleri için etkili gelişen bir uygulama olacaktır³⁸.

Çeşitli Çin geleneksel ilaçlarını içeren Qompsell ekstraktını sazan balıkları (*Cyprinus carpio*)'nda kullanıldığında bağışıklık sistemini güçlendirmektedir³⁸.

Immanuel ve ark.³⁹ yaptıkları bir araştırmada *Ricinus communis*, *Phyllanthus niruri*, *Leucus aspera*, *Manihot esculenta*, *Ulva lactuca*, *Sargassum wightii* bitki türlerinin bütanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Bu bitkilerden *R. communis*'in *Vibrio parahaemolyticus*'a karşı en büyük inhibisyon zonu oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Sivaram ve ark.¹⁹, 10 farklı bitki türünün *V. harvei*'ye karşı antibakteriyal etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada *Ocimum sanctum*, *Withania somnifera*, *Myristica fragrans* bitki ekstraktlarında antibakteriyal etkinin varlığını tespit etmişlerdir. Asha ve ark.⁴⁰ 15 farklı bitki türlerinin ekstraktları *Vibrio harvei*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* balık patojenlerine karşı antibakteriyal etkisini incelemişlerdir. Bu bitki türlerinden *Lawsonia inermis*'in aseton ekstraktı; araştırmalarında kullanılan balık patojenlerine karşı yüksek bir antibakteriyal etki göstermiştir. Düşük toksik etkisi ve yüksek antibakteriyal etkisinden dolayı bu bitki ekstraktı *V. harvei*, *V. parahaemolyticus* ve *A. hydrophila*'nın sebep olduğu hastalıkların tedavisinde alternatif olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir.

Sonuç olarak, kekik yağının bakteriyel hastalıklarda doğal tedavi edici etkisi nedeniyle antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu bildiren^{29,37} çalışma sonuçlarına benzer olarak bu araştırmada bitkisel yağlardan kekik ve melisa yağının bakteriyel balık patojenlerine antibakteriyal aktivitesi belirlenmiştir. Kekik yağı bakteriyel hastalıklarda doğal bir tedavi edici olarak antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu bildirilmiştir^{29,37}. Özellikle kekik yağının *F. psychrophilum*'a karşı tedavide alternatif olabileceği görülmüştür. Bu tür uygulamaların, dirençli bakteri türlerin gelişmesini engelleyerek, balık, insan ve çevre sağlığı açısından yararlı etkileri olacak ve organik balık yetiştiriciliğinde doğal antimikrobiyal madde olarak kullanılabilirliği mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Arda M, Seçer S, Sarıyüpoğlu M: Balık Hastalıkları. s. 142, Medisan Yayınevi, Ankara, 2002.
2. Timur G, Timur M: Balık Hastalıkları. İstanbul Üniv. Su Ürünleri Yetiştiricilik Bölümü, s. 538, İstanbul, 2003.
3. Noga EJ: Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. p. 367, Iowa State University Press, Ames, 2000.
4. Timur G, Timur M: An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 11 (5): 181-182, 1991.
5. Çağırğan H, Yüreklitürk O: First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farm in Turkey. *The Fifth Conference of EAAP Disease of Fish and Shellfish*, Book of Abstracts, 131, 24-29 Ag. 1991.
6. Balta F: Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu,

Cilt II, s. 621-648, 19 Eylül 1997, Eğirdir - Isparta.

7. Çağırğan H: Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*, L) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. *Doktora Tezi*. Ege Üniv Fen Bil Enst, İzmir, 1993.

8. Çağırğan H, Tanrıkuş TT, Balta F: Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eighth International Conference "Diseases of Fish and Shell Fish*. Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists, 14-19 Sep. 1997.

9. Akaylı T: Kültür çipura balıklarında (*Sparus aurata*, L.1758) vibriosis'in elisa ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi. *Doktora Tezi*. İstanbul Üniv Fen Bil Enst, 2001.

10. Korun J, Timur G: Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. *İstanbul Üniv Su Ür Derg*, 12, 15-30, 2001.

11. Diler Ö, Altun S, Adiloğlu AK, Kubilay A, Işıklı BI: First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*O. mykiss*)'in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 22 (1): 21-26, 2002.

12. Diler Ö, Altun S, Işıklı BI: Kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'ün fenotipik karakterleri. *SDÜ Fen Bil Enst Derg*, 7 (1): 1-8, 2003.

13. Ekici S, Diler Ö, Altun S: Kültürü yapılan balıklarda görülen vibrio enfeksiyonları. *XIII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*, Çanakkale, 01-04 Eylül 2005.

14. Schnick RA, Alderman DJ, Armstrong R, Le Gouvello R, Ishihara S, Roth M: World wide aquaculture drug and vaccine registration progress, *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 17 (6): 251-260, 1997.

15. Daly JG: Other bacterial pathogens **In**, Woo PTK, Bruno DW (Eds): Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Viral, Bacterial and Fungal Infection. pp. 577-584, CAB International, 1999.

16. Dos Santos NMS: Development of immunity in sea bass: A study towards vaccination against Pseudotuberculosis. *PhD Thesis*. Cell Biology and Immunology Group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, P.O. Box: 338, 6700 AH, Wageningen, the Netherlands, 2000.

17. Toroğlu S, Çenet M: Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar, *KSÜ Fen ve Müh Derg*, 9 (2): 12-20, 2006.

18. Çelik E, Çelik GY: Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 5 (2): 1-6, 2007.

19. Sivaram V, Babu MM, Immanuel G, Murugadass S, Citarsu T, Marian MP: Growth and immun response of juvenile Greasy Groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveii* infections. *Aquaculture*, 237, 9-20, 2004.

20. Citarsu T, Michael Babu M, Raja Jeya Sekar R, Peter Marian M: Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, *Fabricius. Asian Fish Sci*, 15, 21-32, 2002.

21. Babu MM, Marian MP: Developing bioencapsulated herbal products for maturation and quality larval production in *Penaeus monodon* (L.). **In**, Hendry C, Van Stappen G, Wille M, Sorgeloos P (Eds): Larvi 2001. *3rd Fish and Shell Fish Larviculture Symposium*, Oostende, Belgium, Special Publication, *Eur Aqua Soc*, 30, 40-43, 2001.

22. Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist U: Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquacult*, 252, 79-84, 2006.

23. Marques A, Encarnaçao E, Pedro S, Leonor Nunes M: *In vitro* anti-

microbial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2357-2360, 2008.

24. Sonsuzer Hancı S, Şahin S, Yılmaz L: Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation. *Nahrung/Food*, 47 (4): 252-255, 2003.

25. Azaz AD, Demirci F, Satıl F, Kürkçüoğlu M, Başer KHC: Bazı *Satureja* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.

26. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard of Antimicrobial Susceptibility): Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA, 1993.

27. Borisutpeth P, Kanbutra P, Weerakhun S, Sarachoo K, Portrakulpipat S: Anti-bacterial activity of Thai medicinal plant extracts on *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* isolated from diseased tilapia (*Oreochromis niloticus*). *31 st Congress on Science and Tecnology of Thailand at Suranaree Univ of Technology*, 18-20 October 2005.

28. Austin B, Austin DA: Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. 4th ed., Springer-Praxis publishing, Chichester, p. 594, UK, 2007.

29. Vural C, Özcan S, Toprak G, Erdoğan Ş: *Thymus argaeus* Boiss.& Balansa'un organik ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi. *Biyol Bil Araş Derg*, 1 (1): 17-22, 2008.

30. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard of Antimicrobial Susceptibility): Testing; Eleventh Information Supplement. NCCLS document M100-S11 NCCLS, Pennsylvania, USA, 2001.

31. Baytop T: Türkiye'de bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 40, s. 520, İstanbul, 1984.

32. Özcan S, Toprak G, Torun C, Vural C: *Thymus sipyleus* Boiss subsp. rosulans (Borbas) *J. jalas*'ın organik ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi. *Biyoloji Bilimleri Araş Derg*, 1 (2): 17-22, 2008.

33. Oflaz S, Kürkçüoğlu M, Başer HC: *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subs. *hirtum* üzerine farmokognozok araştırmalar. *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.

34. Kızıl S: Farklı hasat dönemlerinin oğul otu (*Melissa officinalis* L.)'nda bazı tarımsal özellikler üzerine etkisi. *Tar Bil Derg*, 15 (1): 20-24, 2009.

35. Koller WD, Özgüven M, Range P: Composition of essential oil of wild melisa, Landesanstalt für Pflanzenbau, *Z Arzn Gew Pfl*, 4, 39-43, 1999.

36. Toth J, Mrlanova M, Tekelova D, Korenova M: Rosmarinic acid - an important phenolic active compound of lemon balm (*Melisa officinalis* L.). *Acta Facult Pharm Univ Comeniana*, 50, 139-146, 2003.

37. Al-Bayati Firas A: Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, *J Ethnopharmacol*, 116, 403-406, 2008.

38. Wu G, Yuan C, Shen M, Tang J, Gong Y, Li D, Sun F, Huang C, Han X: Immunological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*) after Qompsell feed ingredients for long-term administration, *Aquacult Res*, 38, 246-255, 2007.

39. Immanuel G, Vincybai VC, Sivaram V, Palavesam A, Marian MP: Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236, 53-65, 2004.

40. Asha SV, Anitha S, Anantharajan R: Antibacterial activity of herbal plant extracts towards the fish pathogens. [www. ISPUB.com](http://www.ISPUB.com), *The Internet Journal of Microbiology*, 4 (2): 2008.