



## *Foeniculum vulgare* ve *Origanum onites* Uçucu Yağ Nanoemülsiyonlarının Bakteriyel Balık Patojenlerine Karşı Antibakteriyel ve Antibiyofilm Aktivitesinin Tespiti

Öznur DİLER<sup>1</sup> Lokman AKIN<sup>1</sup> ve Öznur ÖZİL<sup>1</sup>

How to cite: Diler, Ö., Akın, L. & Özil, Ö. (2025). *Foeniculum vulgare* ve *Origanum onites* uçucu yağ nanoemülsiyonlarının bakteriyel balık patojenlerine karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesinin tespiti. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(1), 73-88. <https://doi.org/10.33484/sinopfbid.1558579>

### Araştırma Makalesi

#### Sorumlu Yazar

Öznur ÖZİL  
oznurgormez@isparta.edu.tr

#### Yazarlara ait ORCID

Ö.D: 0000-0003-0330-3448  
L.A: 0000-0001-5990-4440  
Ö.Ö: 0000-0002-7863-2943

Received: 30.09.2024

Accepted: 31.01.2025

### Öz

Bu çalışmada, su ürünleri yetiştiriciliğinde mortalitelere sebep olan *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus warneri* ve *Vagococcus salmoninarum* patojenlerine karşı *Origanum onites* (OEO) ve *Foeniculum vulgare* (FEO) uçucu yağlarının ve nanoemülsiyonlarının antibakteriyel aktivitesi, virülens faktörü olan biyofilm üretiminin tespiti ve antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. OEO ve FEO uçucu yağ ve nanoemülsiyonlarının antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Tüm patojenlere karşı OEO güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. Bu etkinin nanoemülsiyon formunda daha da güçlendiği görülmüştür. Özellikle OEO uçucu yağ nanoemülsiyonunun pozitif kontrol grubuna göre daha güçlü etkisi nedeniyle *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *V. anguillarum* ve *P. damsela* bakterilerinin neden olduğu hastalıklarda doğal bir tedavi edici ürün olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Bakteriyel balık patojenlerinin biyofilm üretimi tüp yöntemi ile incelenmiş olup *V. salmoninarum* ve *S. warneri* türlerinde biyofilm üretimi pozitif olarak tespit edilmiştir. OEO uçucu yağının antibiyofilm aktivitesi için mikropalak yöntemi uygulanmıştır ve konsantrasyonlara bağlı olarak biyofilm aktiviteyi engellediği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tıbbi bitki, bakteriyel balık patojenleri, disk difüzyon yöntemi, biyofilm, mikropalak yöntemi

## Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Foeniculum vulgare* and *Origanum onites* Essential Oil Nanoemulsions Against Bacterial Fish Pathogens

<sup>1</sup>Isparta Uygulamalı Bilimler  
Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri  
Fakültesi, Su Ürünleri  
Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta,  
Türkiye

### Abstract

The present study was conducted to determine the antibacterial and antibiofilm activity of *Origanum onites* (thyme, OEO) and *Foeniculum vulgare* (fennel, FEO) essential oils and nanoemulsions against bacterial species (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus warneri* and *Vagococcus salmoninarum*) that cause mortality in aquaculture. Antimicrobial activities were determined using the disc diffusion method. It was found that the essential oil of OEO exhibited strong antibacterial activity against bacterial fish pathogens. It has been determined that this antibacterial effect is further increased in the nanoemulsion form of the

Bu çalışma Creative Commons  
Attribution 4.0 International  
License ile lisanslanmıştır

oils. Especially, the nanoemulsion form of OEO essential oil showed a stronger impact than the positive control group, indicating its potential as a natural therapeutic agent for treating bacterial diseases caused by *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *V. anguillarum* and *P. damsela* species. The biofilm production of bacterial fish pathogens was examined using the tube method, with positive biofilm production detected in *V. salmoninarum* and *S. warneri* species. The well plate method was applied to determine the antibiofilm activity of OEO. It was determined that it was effective on the decrease in activity.

**Keywords:** Medicinal plant, bacterial fish pathogens, disc diffusion method, biofilm, well plate method

## Giriş

Dünya çapında hızla büyüyen tarım sektörlerinden birisi olan su ürünleri yetiştiriciliğinde, enfeksiyöz etkenlerin neden olduğu hastalıklar nedeniyle ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Antibiyotiklerin yoğun kullanımı, bakteriyel direnç, gıda güvenliği ve ekolojik risklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi nedeniyle [1, 2] enfeksiyonların tedavisi için güvenli alternatif bir uygulamadır. Uçucu yağların çoğu terpenler, terpenoidler ve düşük molekül ağırlıklı diğer aromatik ve alifatik bileşenlerden oluşur. Doğal monoterpenlerin yanı sıra sentetik formları da antifungal, antibakteriyel, antioksidan, antikanser, antibiyofilm, antiaritmik, antiagregan, lokal anestezi, antinosiseptif, antiinflamatuvar, antihistaminik ve antispazmodik aktiviteler gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir [3, 4]. Apiceae (Umbelliferae) familyasına ait rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) dünyada yaygın olarak bulunmakla birlikte, Akdeniz ülkelerinde doğal olarak yetişmektedir. Son yıllarda tohumlarının (meyvelerinin) yüksek besin değeri nedeniyle ılıman ve tropik iklim bölgelerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Rezene yapraklarından elde edilen ekstraktlar, vitaminler (A, C, tiamin, riboflavin ve niasin), mineraller (potasyum, sodyum, kalsiyum ve manganez) [5] ve n-3 yağ asitleri (özellikle yapraklarda bulunur) [6] açısından önemli kaynaklardır. Biyoaktif bileşikler (fenolik asitler, tokoferoller, flavonoidler, terpenoidler, karotenoidler) ve uçucu yağlar açısından zengin olan bu ekstraktların eczacılık ve gıda sanayisinde kullanıldığı ve antibakteriyel, antifungal ve antioksidan gibi biyoaktif özellikleri olduğu bilinmektedir [7-9]. *Origanum onites* L. (*O. onites*) Lamiaceae familyasına ait çok yıllık ve otsu bir bitki türüdür. *O. onites* L. Türk kekiği olarak bilinir ve Akdeniz kıyıları boyunca yayılmıştır. Türkiye'de yerel halk tarafından 'kırkbaş kekik', 'koca lealı kekik', 'tokalı kekik', 'bilya kekik', 'arı kekiği', 'eşek kekiği', 'deli kekik', 'kara kekik', 'taş kekiği', 'dağ kekiği' ve 'akbaş kekik' gibi isimlerle de anılmaktadır [10]. *Origanum* türleri, esas olarak karvakrol ve timol içeren uçucu yağlar bakımından zengindir. Söz konusu bitkiden elde edilen uçucu yağın antifungal, antimikrobiyal, antioksidan, insektisidal, hepatoprotektif ve sitotoksik aktiviteleri bulunmaktadır [10]. Ayrıca, bitkinin uçucu yağlarının enfeksiyon etkeni, *A. salmonicida*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* ve *Micrococcus luteus* türleri üzerinde önemli *in vitro* antibakteriyel aktivite sağladığı belirlenmiştir [11]. Nanoteknoloji, 0.1 nanometre ile 100

nanometre arasındaki boyutlarda fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların araştırıldığı bir teknolojidir [12]. Biyoaktif moleküllerin düşük olan biyoyararlanımı, kararlılığı ve çözünürlüğünün, özellikle nano formülasyonlarla iyileştirilebileceği öne sürülmüştür. Nanoteknolojik bir ürün olan nanoemülsiyon sistemler ortalama damlacık çaplarının 50 ile 1000 nm arasında değiştiği yağ içinde su emülsiyonları olarak tanımlanmaktadır. Nanoemülsiyonlar, FDA tarafından “Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan” (GRAS) insan tüketimi için onaylanmış yüzey aktif maddelerden ve yaygın gıda maddelerinden üretilmektedirler. Nanoemülsiyon haline getirilmiş ürünlerin çözünürlüğü artmakta, daha yüksek fiziksel stabilite sağlanmakta ve düşük konsantrasyonlarda bile daha gelişmiş antimikrobiyal etki sunabilmektedirler [13, 14]. Ayrıca bu ürünler geniş spektrumlu antibakteriyel, antifungal ve antiparaziter ajan olarak kullanılabilmekte ve mukozal aşılar, hastalık tedavilerinde ve dezenfektan olarak da geniş bir kullanım alanı bulmaktadırlar [15-17]. Bakteriler için bir virulens faktörü olan biyofilmler, hücrelerin birbirine bağlandığı ve biyotik ya da abiyotik bir yüzeye yapıştığı karmaşık bir mikroorganizma matrisidir. Dünyadaki mikrobiyal biyokütlenin %80’ni biyofilm halinde bulunur ve bu nedenle, doğadaki mikroorganizmalar için baskın yaşam biçimi olarak kabul edilirler [18]. Biyofilmler, klinik ve endüstriyel ortamlardan gıda işleme tesislerine ve içme suyu dağıtım sistemlerine kadar çeşitli ortamlarda bulunan polisakkaritler, proteinler ve diğer organik bileşenlerden oluşan yapışkan bir jel oluştururlar [19, 20]. Biyofilmler, mikroorganizmaları antibiyotiklere karşı daha dirençli kılan hücre dışı matris tarafından korunur. Biyofilmleri parçalamak ve ortadan kaldırmak için biyofilm matrisini hidrolize etmek gereklidir. Biyofilmler içindeki bakteriler, süspansiyondaki planktonik hücrelere göre antibiyotiklere ve kimyasal ajanlara daha dirençlidir [21, 22]. Sonuçta geleneksel antimikrobiyal ajanlar ve antibiyotikler, biyofilmlere karşı etkisiz hale gelir ve daha yüksek antibiyotik kullanım dozları nedeniyle antibiyotiklere direnç riski artar [23]. Bu nedenle su ürünleri yetiştiriciliğinde balık hastalıklarıyla mücadelede bakterilerin biyofilm üretimini önleyen güvenilir ürünlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın amacı, OE ve FEO uçucu yağları ve nanoemülsiyon formülasyonlarının bakteriyel balık patojenlerine karşı (*A. hydrophila*, *V. anguillarum*, *P. damsela*, *L. garvieae*, *S. warneri* ve *V. salmoninarum*) antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti ve OEO uçucu yağının antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesidir.

## **Materyal ve Metot**

### **Bitkisel Uçucu Yağlar ve Nanoemülsiyonlarının Hazırlanması**

Araştırmada, OEO ve FEO uçucu yağları ticari bir firmadan (Manolya Doğal ve Aromatik Ürünler Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti) satın alınmıştır. Uçucu yağların nanoemülsiyonları, yağ fazının kekik ve rezene uçucu yağlarından oluşan, etanol ve sürfektan (Tween 80) kimyasallarının ilave edildiği bir su-yağ emülsiyonu şeklinde hazırlanmıştır. Stok emülsiyon çözeltisinin %80’ni yağ ve %20’si su olacak şekilde Hamouda ve ark. [24] tarafından kullanılan yöntemle göre formüle edilmiştir. Daha sonra emülsiyon

edilmiş yağ karışımının nanoboyuta geçebilmesi amacıyla ultrasonik homojenizatör kullanılmış ve yağ formülasyonları 15 dakika boyunca homojenize edilmiştir (Şekil 1).



***Şekil 1. OEO ve FEO uçucu yağlarının nanoemülsiyonlarının hazırlanması***

### **Bakteriyel Balık Patojenleri**

Araştırmada, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Hastalık Laboratuvarı'nda balık çiftliklerinde görülen hastalık salgınlarından izole edilen *A. hydrophila*, *V. anguillarum*, *P. damsela*, *L. garviae*, *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakteri suşları kullanılmıştır.

### **Antibakteriyel Aktivitenin Tespiti**

Antibakteriyel aktivite tespiti için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, uçucu yağlar 1000-7.8 µl/ml konsantrasyon aralıklarında Dimetil sülfoksit (DMSO) ile, nanoemülsiyonlar ise steril saf su ile homojenize edilmiştir. Daha sonra her bir konsantrasyon 3 paralel olacak şekilde steril disklere 25 µl emdirilmiştir. Pozitif kontrol grubunda, standart olarak kullanılan hazır antibiyotik diskleri kullanılmış olup her patojen için etkili olan (*A. hydrophila* için gentamisin-10 µg/disk, *L. garviae* için streptomisin-10 µg/disk, *V. anguillarum* için tetrasiklin-30 µg/disk, *P. damsela* için eritromisin-15 µg/disk, *S. warneri* için enrofloksasin-5 µg/disk, *V. salmoninarum* için flor fenikol-30 µg/disk) antibiyotikler seçilmiştir. Negatif kontrol grubunda ise DMSO ve steril saf su kullanılmıştır. Disk difüzyon testinde, *A. hydrophila*, *L. garviae*, *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakterileri için triptik soy agar (TSA), *V. anguillarum* ve *P. damsela* için ise NaCl ilaveli (%1) TSA kullanılmıştır. Yoğunlukları, Mc Farland 0.5'e göre ayarlanan bakteriler ( $10^8$  kob/ml) 100 µl/100 ml besiyeri şeklinde eklenerek petri kaplarına döküm yapılmıştır. Agar katılaştıktan hemen sonra uçucu yağ ve nanoemülsiyon ilaveli diskler yerleştirilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında disk etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek ortalamaları alınmıştır [25].

### **Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi**

Christensen ve ark. [26] tarafından bildirilen tüp yöntemine göre, test edilecek bakteri suşlarının agar'da üreyen saf kültüründen tek bir koloni alınarak, içinde 5 ml %0.25 glukoz içeren triptik soy broth (TSB)

besiyerine inokule edilerek 25°C’de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılmış, %0.1’lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Boya dökülerek, tüpler steril pepton buffer solüsyon (PBS) ile iki defa yıkanmış ve ters çevrilerek kurutma kâğıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu gözlenmiştir. Tüm patojenler 3 paralel olarak çalışılmıştır [27].

### **Antibiofilm Aktivitenin Belirlenmesi**

Antibiyofim aktivitenin tespiti için, mikropalak yöntemi kullanılmıştır. TSB’ye McFarland standardına göre 0.5’e ayarlanmış 100 µl bakteri hücre süspansiyonu eklenmiştir ve 25°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µl/ml gibi farklı konsantrasyonlarda bitki uçucu yağı eklenerek 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir [28]. İnkübasyondan sonra sıvı süspansiyon uzaklaştırılmış ve 100 µl %1’lik kristal viyole çözeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika süreyle boyamanın ardından boya uzaklaştırılarak kuyucuklar %95 etanol ilave edilerek yıkanmış ve 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımı 570 nm’de spektrofotometrik olarak okunmuştur.

### **Veri Analizi**

Çalışmada, Duncan çoklu karşılaştırma testleri ile varyasyon analizleri yapılmış ve test gruplarından elde edilen veriler arasındaki ilişkileri değerlendirmek için gruplar arası farklar SPSS 18 istatistik programı ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık  $P < 0.05$  olarak seçilmiştir.

### **Bulgular**

#### **Antibakteriyel Aktivite**

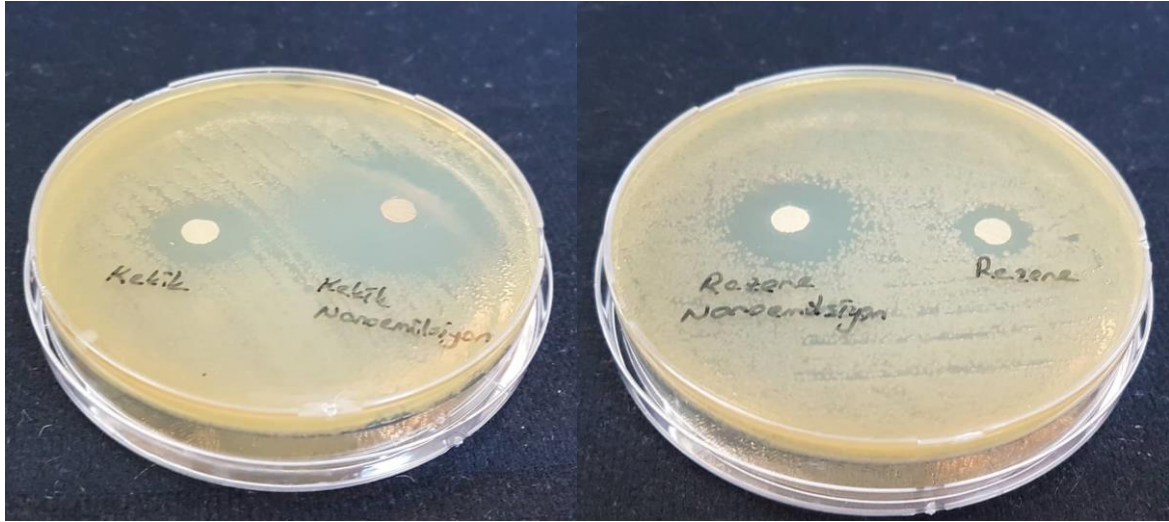
Disk difüzyon testi sonucunda, *S. warneri*’ye karşı OEO test edilen tüm konsantrasyonlarda güçlü bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. 1000 µl/ml konsantrasyonda ise pozitif kontrolden daha etkili olmuştur. *V. salmoninarum* türünde ise OEO, 1000 ve 500 µl/ml konsantrasyonda güçlü antimikrobiyal etki göstermesine rağmen pozitif kontrole göre daha az etkili olmuştur (Tablo 1). *A. hydrophila* için en iyi antibakteriyel etkinin OEO nanoemülsiyon formunun 1000 ve 500 µl/ml konsantrasyonunda olduğu görülmüştür. Tespit edilen bu etkinin antibiyotiklerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ) (Tablo 1). OEO’nun *A. hydrophila*’ya karşı antibakteriyel etkisinin olduğu ancak bu etkinin pozitif kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür. *L. garvieae* bakterisinde en iyi antibakteriyel etki OEO nanoemülsiyon formunun 1000, 500 ve 250 µl/ml konsantrasyonlarında tespit edilmiş ve standart olarak kullanılan antibiyotiklere göre daha etkili olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). OEO’nun *L. garvieae*’ye karşı antibakteriyel etkisinin olduğu ancak bu etkinin pozitif kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 1).

**Tablo 1.** OEO ve FEO uçucu yağları ve nanoemülsiyonlarının farklı konsantrasyonda antibakteriyel etkileri (inhibisyon zonu, mm)

|                        | Konsantrasyon<br>(µl/ml) | OEO                           | OEO<br>(Nanoemülsiyon)        | FEO                           | FEO<br>(Nanoemülsiyon)        |
|------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>A. hydrophila</i>   | 1000                     | 20.00±0.00 <sup>c</sup>       | <b>36.00±1.41<sup>a</sup></b> | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 8.50±0.00 <sup>h</sup>        |
|                        | 500                      | 13.00±1.41 <sup>f</sup>       | 22.50±0.70 <sup>b</sup>       | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        |
|                        | 250                      | 11.00±1.41 <sup>g</sup>       | 17.00±1.41 <sup>d</sup>       | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        |
|                        | 125                      | 10.50±0.70 <sup>g</sup>       | 15.50±0.70 <sup>e</sup>       | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        |
|                        | 62.5                     | 8.00±2.82 <sup>h</sup>        | 15.00±0.00 <sup>e</sup>       | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        |
|                        | Gentamisin               | 22.50±0.70 <sup>b</sup>       | 22.50±0.70 <sup>b</sup>       | 22.50±0.70 <sup>b</sup>       | 22.50±0.70 <sup>b</sup>       |
|                        | Negatif Kontrol          | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        | 0.00±0.00 <sup>i</sup>        |
| <i>L. garvieae</i>     | 1000                     | 16.50±0.70 <sup>de</sup>      | <b>26.00±1.41<sup>a</sup></b> | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 7.00±0.00 <sup>i</sup>        |
|                        | 500                      | 15.50±0.70 <sup>e</sup>       | 22.50±3.53 <sup>b</sup>       | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        |
|                        | 250                      | 15.50±2.12 <sup>e</sup>       | 22.50±3.53 <sup>b</sup>       | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        |
|                        | 125                      | 15.00±0.00 <sup>ef</sup>      | 19.50±0.70 <sup>c</sup>       | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        |
|                        | 62.5                     | 11.50±2.12 <sup>gh</sup>      | 19.00±1.41 <sup>c</sup>       | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        |
|                        | Streptomisin             | 18.50±0.70 <sup>cd</sup>      | 18.50±0.70 <sup>cd</sup>      | 18.50±0.70 <sup>cd</sup>      | 18.50±0.70 <sup>cd</sup>      |
|                        | Negatif Kontrol          | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        | 0.00±0.00 <sup>j</sup>        |
| <i>V. anguillarum</i>  | 1000                     | 17.50±0.70 <sup>g</sup>       | <b>35.50±0.70<sup>a</sup></b> | 8.50±0.00 <sup>l</sup>        | 15.50±2.12 <sup>hij</sup>     |
|                        | 500                      | 17.00±0.00 <sup>gh</sup>      | <b>34.00±1.41<sup>a</sup></b> | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        |
|                        | 250                      | 16.50±0.70 <sup>ghi</sup>     | 26.50±0.70 <sup>b</sup>       | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        |
|                        | 125                      | 16.00±0.00 <sup>ghj</sup>     | 25.00±0.00 <sup>bc</sup>      | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        |
|                        | 62.5                     | 15.00±1.41 <sup>ij</sup>      | 23.50±0.70 <sup>cd</sup>      | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        |
|                        | Tetrasiklin              | 21.00±1.41 <sup>ef</sup>      | 21.00±1.41 <sup>ef</sup>      | 21.00±1.41 <sup>ef</sup>      | 21.00±1.41 <sup>ef</sup>      |
|                        | Negatif Kontrol          | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        | 0.00±0.00 <sup>m</sup>        |
| <i>P. damsela</i>      | 1000                     | 24.00±1.41 <sup>ef</sup>      | <b>38.50±0.70<sup>a</sup></b> | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        |
|                        | 500                      | 22.50±3.53 <sup>fg</sup>      | 35.00±0.00 <sup>b</sup>       | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        |
|                        | 250                      | 22.50±3.53 <sup>fg</sup>      | 32.50±0.70 <sup>b</sup>       | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        |
|                        | 125                      | 21.00±1.41 <sup>g</sup>       | 29.50±0.70 <sup>c</sup>       | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        |
|                        | 62.5                     | 16.50±0.70 <sup>h</sup>       | 29.00±1.41 <sup>cd</sup>      | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        |
|                        | Eritromisin              | 26.50±0.70 <sup>de</sup>      | 26.50±0.70 <sup>de</sup>      | 26.50±0.70 <sup>de</sup>      | 26.50±0.70 <sup>de</sup>      |
|                        | Negatif Kontrol          | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        | 0.00±0.00 <sup>l</sup>        |
| <i>S. warneri</i>      | 1000                     | <b>34.50±0.50<sup>a</sup></b> | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 500                      | 31.00±1.00 <sup>b</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 250                      | 29.00±1.00 <sup>c</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 125                      | 27.00±0.00 <sup>d</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 62.5                     | 25.00±0.00 <sup>e</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | Enrofloksasin            | 32.00±0.00 <sup>b</sup>       | 32.00±0.00 <sup>b</sup>       | 32.00±0.00 <sup>b</sup>       | 32.00±0.00 <sup>b</sup>       |
|                        | Negatif Kontrol          | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        |
| <i>V. salmoninarum</i> | 1000                     | 29.00±1.00 <sup>b</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 500                      | 25.00±0.00 <sup>c</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 250                      | 13.50±0.50 <sup>d</sup>       | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 125                      | 9.50±0.50 <sup>e</sup>        | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | 62.5                     | 9.00±0.00 <sup>e</sup>        | nd                            | nd                            | nd                            |
|                        | Flor fenikol             | <b>32.00±0.00<sup>a</sup></b> | <b>32.00±0.00<sup>a</sup></b> | <b>32.00±0.00<sup>a</sup></b> | <b>32.00±0.00<sup>a</sup></b> |
|                        | Negatif Kontrol          | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        | 0.00±0.00 <sup>f</sup>        |

-nd: belirlenmeyen değer

*V. anguillarum* için OEO nanoemülsiyon formunun çalışılan tüm konsantrasyonlarda güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir ve antibiyotiklere göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). OEO'nun *V. anguillarum*'a karşı antibakteriyel etkisinin olduğu ancak bu etkinin pozitif kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 1). FEO nanoemülsiyon formunun ise 1000 µl/ml konsantrasyonda  $15.50\pm2.12$  mm zon çapı ile düşük bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 1) (Şekil 2).



Şekil 2. OEO ve FEO uçucu yağı ve nanoemülsiyonlarının *V. anguillarum* bakterisinde oluşturduğu inhibisyon zonları

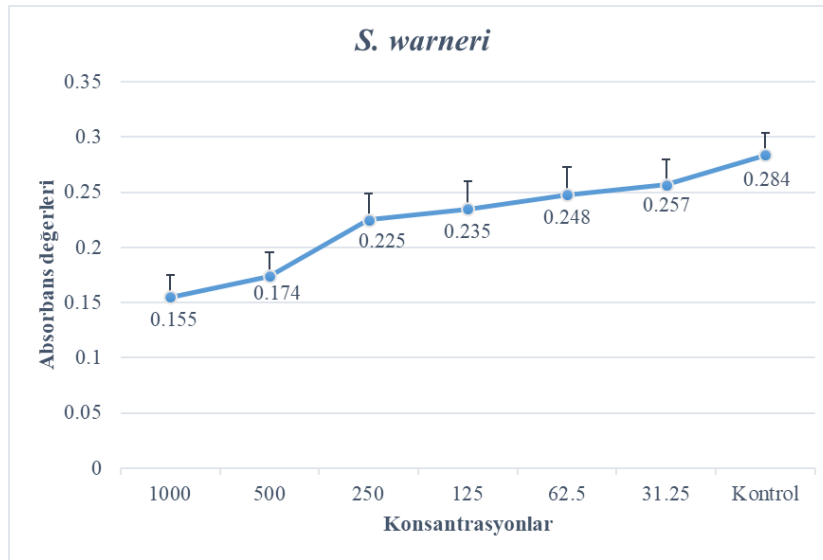
*P. damsela*e bakterisi için OEO nanoemülsiyon formunun 1000, 500, 250 ve 125 µl/ml konsantrasyonda güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiği ve antibiyotiklere göre daha etkili olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). OEO'nun *P. damsela*e'ya karşı antibakteriyel etkisinin olduğu ancak bu etkinin pozitif kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 1).

### Biyofim Üretimi ve Antibiyofim Aktivite

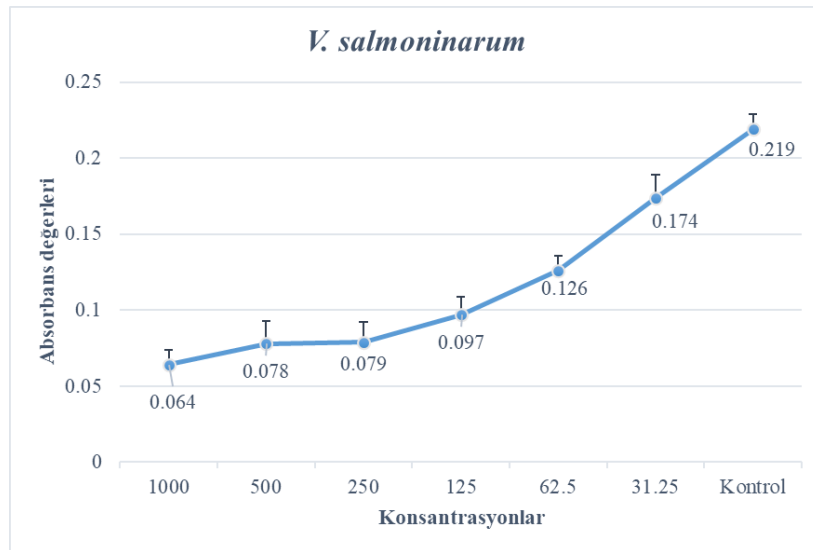
Antibakteriyel etkisi belirlenen balık patojenlerinin biyofilm üretimlerinin tespiti amacıyla yapılan tüp yönteminde, sadece *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakteri türlerinde biyofim üretimi belirlenmiştir (Şekil 3). *L. garvieae*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* türlerinde biyofilm üretimi tespit edilmemiştir. Antibakteriyel etkisi yüksek olan OEO uçucu yağının, biyofilm aktivitesi bu çalışma ile tespit edilen *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakterinde antibiofilm aktivitesi belirlenmiş olup bu etkinin yağın konsantrasyonuna bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4, 5).



Şekil 3. Tüp yönteminde *S. warneri* ve *V. salmoninarum* suşlarında biyofilm üretimi



Şekil 4. Konsantrasyona bağlı olarak OEO uçucu yağının *S. warneri*'nin biyofilm üretimi üzerine etkisi



Şekil 5. Konsantrasyona bağlı olarak OEO uçucu yağının *V. salmoninarum*'un biyofilm üretimi üzerine etkisi

**Tartışma ve Sonuç**

Antibiyotik ve kemoterapötik ajanlar su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu uygulamalar çevreyi olumsuz etkilemenin yanında bakterilerde antimikrobiyal direnç oluşturmaktadır. Bu nedenle, hastalıklarla mücadelede etkin bir şekilde kullanılabilen alternatif ve güncel uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır [29]. Uçucu yağlar, tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen, güçlü antimikrobiyal etkileri sayesinde mikroorganizmaların çoğalmasını önleyen ürünlerdir [3, 4]. Tyagi ve Malik [30] uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesinin yapılarında bulunan alkol, fenol, terpen ve keton gibi fonksiyonel gruplar ve bunların bileşimdeki oranlarından ileri geldiğini bildirmiştir. Uçucu yağların hidrofobik özellikleri sayesinde mikroorganizmaların hücre membranlarında birikerek geçirgenliğin artmasına neden oldukları tespit edilmiştir [31]. Uçucu yağ nanoemülsiyon formları ise, artan yüzey alanı ve küçük damlacık boyutu nedeniyle uçucu yağa kıyasla daha yüksek antibakteriyel etkinlik göstermektedir. Nanoemülsiyonların antimikrobiyal özelliklerinin, yüksek yüzey gerilimine sahip küçük yağ parçacıklarından kaynaklandığı ve prokaryotik hücreler, virüsler ve ökaryotik mantar hücre zarlarını parçalayarak bu etkiyi yaptığı bildirilmiştir [32]. Nanoemülsiyonlar patojenlerin hücre zarındaki çift lipid tabakasına zarar vermekte, depolanan enerjiyi serbest bırakmakta ve hücre lizisi yoluyla istilacı mikroorganizmaları öldürmektedirler. Nanoemülsiyonların en önemli özellikleri, konakçı hücreye zarar vermeden, mikroorganizmaya karşı gösterdiği seçici toksisitedir. Ayrıca nanoemülsiyonların antimikrobiyal aktivitesi, antibiyotiklerin aksine spesifik değildir ve bu özellikleri ile geniş spektrumlu aktivite sağlamak ve mikroorganizmalar bu ürünlere karşı direnç gelişimi gösterememektedirler. İlaç olarak kullanılan nanoemülsiyonların, yüksek emilim oranları ve stabil olmaları, hidrofobik ilaç etkenlerinin çözünürlüğünü kolaylaştırmaları ve biyoyararlanımlarını artırmaları, kolay uygulanabilirlikleri, gelişmiş penetrasyon potansiyelleri gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Ayrıca, nanoemülsiyonlar ilaç moleküllerinin hidroliz ve oksidasyona karşı güçlendirme özelliklerine de sahiptirler [33, 34]. Wei ve ark. [35] yaptıkları çalışmada, çay ağacı uçucu yağ nanoemülsiyonunu antibiyotiklerle birlikte mikroorganizmaları öldürmek amacıyla kullanmışlardır. Çalışma sonunda uçucu yağ nanoemülsiyonlarının çoklu ilaç direncine sahip *Escherichia coli* bakterisine karşı antibiyotiklerin etkinliğini artırdığı ve 30 pasaj boyunca bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin değişmediğini görmüşlerdir. Aynı zamanda söz konusu bu etkiyi bakterinin dış ve iç zarlarını bozarak ve zar geçirgenliği ile ilgili olan AcrAB-TolC efflux pompasını inhibe ederek sağladığını tespit etmişlerdir. Bu araştırma sonuçlarında, balık patojenlerinden *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *V. anguillarum* ve *P. damsela* türlerine karşı, OEO uçucu yağının nanoemülsiyon formunda standart antibiyotiklerden daha güçlü bir antibakteriyel etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonda (62.5, 125, 250, 500 ve 1000 µl/ml) kullanılan uçucu yağlarda doz artışına paralel olarak antibakteriyel etkinin arttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda OEO ve FEO uçucu yağlarının nanoemülsiyon formlarının uçucu yağlara göre daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilediği belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). FEO uçucu yağ ve

nanoemülsiyon formunun ise test edilen patojenlere karşı çok düşük bir antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer bir şekilde yapılan diğer bir araştırmada, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas veronii* ve *Vibrio alginolyticus* bakteri türlerine karşı *Origanum onites* uçucu yağı ve nanoemülsiyon formu çalışılmıştır. Bu çalışmada, *O. onites* nanoemülsiyon formunun Gram-negatif bir bakteri olan *Aeromonas veronii*'ye karşı uçucu yağ ve pozitif kontrole (enrofloksasin) göre daha güçlü bir antibakteriyel etkisi olduğu tespit edilmiştir [36]. El-Ekiaby ve ark. [37] yaptıkları çalışmada, fesleğen uçucu yağ nanoemülsiyonunun *Aeromonas hydrophila*'ya karşı  $20.5 \pm 2.7$  mm zon çapı ile antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda ise *A. hydrophila*'ya karşı OEO uçucu yağı nanoemülsiyonundan elde edilen antibakteriyel etkinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Taşar ve ark. [38], *Foeniculum vulgare* Mill. ve *Pimpinella anisum* L. bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerini incelemişlerdir. Uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Escherichia coli* ve *Serratia marcescens* patojenlerine karşı incelenmiştir. *F. vulgare* uçucu yağında standart olarak kullanılan antibiyotiklere paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bir diğer çalışmada *F. vulgare* yapraklarından elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal, antibiyofil ve antioksidan etkinliği araştırılmış ve *F. vulgare* uçucu yağının hem Gram pozitif hem de Gram negatif suşlara karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir [39]. *F. vulgare* uçucu yağlarının antibakteriyel (*Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas pyocyaneus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*) ve antifungal aktiviteleri (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces fragilis*) disk difüzyon metoduna göre incelenmiştir. Uçucu yağın, Gentamisin, Sefalotin ve Seftriakson antibiyotikleriyle beraber kullanıldığında antibakteriyel veya antifungal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir [40]. Bu çalışmada ise diğer çalışmalardan farklı olarak FEO uçucu yağının sadece *V. anguillarum* bakteri türünde orta derecede etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada FEO uçucu yağının nanoemülsiyon formunun *A. hydrophila*, *L. garvieae* ve *V. anguillarum* türlerindeki antibakteriyel etkisi ilk defa belirlenmiştir. Son yıllarda biyofilm oluşumunun ve bakteriyel patojenlerin antibiyotik toleransını arttırması ve dolayısı ile antibiyotik direncine neden olması, su ürünleri yetiştiriciliği enfeksiyonlarının kontrolünü zorlaştırmaktadır. Biyofilm enfeksiyon sürecinde bakteriye ciddi bir etkinlik kazandırmakta ve tedaviye engel olmaktadır. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarında biyofilm oluşturacakları yüzeyin yapısı, hidrofilik veya hidrofobik karakterde oluşu önemlidir. Yüzeye yapışarak biyofilm oluşturabilme, aynı zamanda bir bakterinin sahip olduğu yüzey yapılarının karakteristiği ile de ilgili olabilmektedir [41]. Characklis ve Marshall [42] yüzey pürüzlülüğü arttıkça mikrobiyal kolonizasyonun da arttığını göstermişlerdir. Howell ve Behrends [43], mikrobiyal yapışma ile yüzey pürüzlülüğü arasındaki pozitif ilişkiyi rapor etmişlerdir. Bunun sebebinin yüzey geriliminin azalması ve pürüzlü yüzeylerde yüzey alanının daha fazla olmasıyla açıklamışlardır. Cai ve

Arias [44] yaptıkları çalışmada, önemli balık patojenlerinin (*Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda* ve *E. piscicida*) farklı yüzeylerdeki (bambu direk, gemi yüzeyi, PVC ve daldırma ağı) biyofilm oluşturma kapasitesini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda test edilen tüm su ürünleri yetiştiriciliği materyallerinde söz konusu bakterilerin kolonileşip çoğalabilmesi nedeniyle çiftliklerdeki biyogüvenlik uygulamalarında dezenfektanların yalnızca suda değil, aynı zamanda yüzeylerde de etkilerinin incelenmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile test edilen bakterilerden *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakteri türlerinin biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Benzer bir çalışmada, Filik ve Kubilay [45], biyofilm tespiti için kullandıkları tüp yönteminde *F. psychrophilum*, *A. sobria* ve *S. warneri* bakteri türlerinde tüpün iç yüzeyinde film tabakasının oluştuğunu, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* türlerinde ise biyofilm üretiminin olmadığını bildirmişlerdir. Biyofilmlerdeki bakteriler, süspansiyondaki planktonik hücrelere göre antibiyotiklere ve kimyasal ajanlara karşı daha dirençlidir. Çünkü biyofilmlere nüfuz etmek ve parçalamak için biyofilm matrisini hidrolize etmek gereklidir. Özellikle bitkisel ürünlerin güçlü bir antibiyofilm aktivite gösterdiği bildirilmiştir [20, 46]. Zammuto ve ark. [47] yaptıkları çalışmada yeni çevre dostu antibiyofilm molekülleri tanımlamak için Ganzirri' nin (Messina, İtalya) acı gölünden toplanan *Chaetomorpha aerea* (Dillwyn) Kützinger (Chlorophyta), *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & MJ Wynne (Rhodophyta) ve *Hypnea cornuta* (Kützinger) J. Agardh'ın (Rhodophyta) makroalgaların su ekstraktları veya polisakkaritlerinin, su ürünleri yetiştiriciliği için önemli olan farklı patojenlerin (*L. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* ve *P. damsela* subsp. *piscicida*) biyofilm oluşumuna karşı aktivitelerini incelemiştir. Tüm bakteri suşlarının biyofilm üretebildiği ve en yüksek konsantrasyonda (400 µg/ml), *C. aerea* ve *A. subulata* ekstraktlarının *V. harveyi* (%59 ve 53)'nin, *H. cornuta* ekstraktının ise *P. piscicida* (%52) ve *V. parahaemolyticus* (%28)'un biyofilm üretimini azalttığı belirlenmiştir. *A. subulata* ekstraktının ayrıca *P. piscicida* (%48) ve *L. anguillarum*'un (%33) biyofilm oluşumuna karşı da etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan alg ekstraktlarının patojenlerin yapışmasını engelleyebildiği ve hücre yüzey özelliklerini ve hidrofobitesini değiştirebildiği belirlenmiştir. Uçucu yağlar, bakterilere, mantarlara ve virüslere karşı geniş spektrumlu etkinliklere sahip doğal antimikrobiyal formülasyonlardır. ATP üretimini ve ATPaz aktivitesini inhibe edebilmektedirler. Ayrıca, zar geçirgenliğini bozabilmekte, membran yağ asitlerini değiştirerek metabolitlerin ve iyonların sızmasına yol açabilmektedirler. Bazı uçucu yağlar, Quorum sensing (QS) genlerini engelleyerek ve düzenleyerek QS inhibitörleri (QSI) olarak işlev görürler ve bu da biyofilm oluşumunda ve virülans faktörü üretiminde azalmaya yol açmaktadır [48, 49]. Yaptığımız çalışmada, OEO uçucu yağının, *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakteri türlerinde antibiofilm aktiviteye sahip olduğu konsantrasyon artışına bağlı olarak bu etkinin arttığı belirlenmiştir. Snoussi ve ark. [50], *Vibrio* spp. suşlarına karşı *Petroselinum crispum* (6-17.33 mm) ve *Ocimum basilicum* (8.67-23.33 mm) bitkisi uçucu yağlarının antibakteriyel etkiye sahip olduğu aynı zamanda her iki uçucu yağında düşük konsantrasyonlarda bile polistiren yüzeyinde oluşan olgun biyofilmi inhibe edebildiği ve ortadan

kaldırabildiği bildirilmiştir. Özellikle *O. basilicum* uçucu yağının güçlü bir antibiyofilm aktivite oluşturduğu ve bu etkinin de yağın kimyasal bileşiminde bulunan linalool bileşiğinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Uçucu yağların kimyasal bileşiklerinin antibiyofilm aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, Da Silva ve ark. [51], gümüş yayın balığından (*Rhamdia quelen*) izole edilen bazı bakterilere (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *C. freundii*, *R. ornithinolytica* ve *S. maltophilia*) karşı R-(+)-limonen ve S(-)-limonen fitokimyasallarının antibakteriyel aktivitesini analiz etmiştir. Ayrıca, biyofilm oluşumunu engelleme açısından aktiviteleri araştırılmıştır. Fitokimyasalların *A. hydrophila* suşunda en fazla etkiye sahip olduğu ve biyofilm oluşumunu güçlü bir şekilde engellediği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, OEO uçucu yağının antibiyofilm aktivitesinin içeriğindeki timol ve karvakrol gibi terpenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda genel olarak, terpen içeren uçucu yağların antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda, uçucu yağların ana bileşenleri olan terpenlerin membran lipid katmanlarından geçerek hücrenin geçirgenliğini değiştirdiği belirtilmiştir [52]. Sonuç olarak bu çalışma ile kekik ve rezene bitkisi uçucu yağ ve nanoemülsiyonlarının bakteriyel balık patojenlerine (*S. warneri*, *V. salmoninarum*, *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *V. anguillarum* ve *P. damsela*) karşı etkileri değerlendirilmiştir. Bakteriyel balık patojenlerine karşı kekik bitkisi uçucu yağının rezene bitkisi uçucu yağına göre daha güçlü antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu antimikrobiyal etkinin nanoemülsiyon formunda daha da arttığı tespit edilmiştir. Özellikle kekik bitkisi nanoemülsiyon formunun *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *V. anguillarum* ve *P. damsela* bakterilerinin neden olduğu hastalıklara karşı doğal bir antimikrobiyal madde olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca antibakteriyel etkisi yüksek olan kekik uçucu yağının *S. warneri* ve *V. salmoninarum* bakteri türlerinin biyofilm formasyonunu da inhibe ettiği görülmüştür.

**Teşekkür** Bu çalışmanın antibakteriyel etkinin belirlenmesi bölümüne 2209-B Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı ile maddi olarak destek veren TÜBİTAK' a teşekkür ederiz.

**Fon/Finansman bilgileri** Bu çalışmanın antibakteriyel etki kısmı TÜBİTAK 2209-B Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

**Etik Kurul Onayı ve İzinler** Çalışma etik kurul izni veya herhangi bir özel izin gerektirmemektedir.

**Çıkar çatışmaları/Çatışan çıkarlar** Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

**Yazarların Katkısı** Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamıştır

## **Kaynaklar**

- [1] Metin, S., & Biçer, Z. I. (2020). Antibacterial activity of some essential oils againsts *Vagococcus salmoninarum*. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(2), 167-173. <http://doi.org/10.12714/egejfas.37.2.07>

- [2] Özil, Ö., & Diler Ö. (2023). Effect of dietary *Origanum onites* on growth, non specific immunity and resistance against *Yersinia ruckeri* of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 95(2), e20200952. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320200952>
- [3] Baydar, H. (2009). *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi* (Genişletilmiş 3. Baskı). SDÜ Yayınları No: 51, s:194-212, Isparta.
- [4] Evren, M., & Tekgüler, B. (2011). Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(3), 28-40.
- [5] Saddiqi, H. A., & Iqbal, Z. (2011). *Usage and Significance of Fennel (Foeniculum Vulgare Mill.) Seeds in Eastern Medicine*. Elsevier, pp. 461–467, Amsterdam, The Netherlands.
- [6] Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT-Food Science and Technology*, 43(5), 814–818. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.010>
- [7] Salami, M., Rahimmalek, M., & Ehtemam, M. H. (2017). Comprehensive research on essential oil and phenolic variation in different *Foeniculum vulgare* populations during transition from vegetative to reproductive stage. *Chemistry & Biodiversity*, 14(2), e1600246. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600246>
- [8] Kalleli, F., Bettaieb Rebey, I., Wannes, W. A., Boughalleb, F., Hammami, M., Saidani Tounsi, M., & Hamdi, M. (2019). Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 43(8), 1-14. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12935>
- [9] Egidio, M., Casalino, L., De Biasio, F., Di Paolo, M., Gómez-García, R., Pintado, M., Sardo, A., & Marrone, R. (2024). Antimicrobial properties of fennel by-product extracts and their potential applications in meat products. *Antibiotics*, 13(10), 932-952. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13100932>
- [10] Tepe, B., Cakir, A., & Sihoglu Tepe, A. (2016). Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology of *Origanum onites* (L.): A Review. *Chemistry & Biodiversity*, 13(5), 504-520. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500069>
- [11] Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J., & Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1190-1195. <https://doi.org/10.1021/jf040083t>
- [12] Tüylek, Z. (2021). Reflections to our lives in nanotechnology applications. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(2), 69-79. <https://orcid.org/0000-0002-9086-1327>
- [13] Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(3), 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- [14] Yazgan, H. (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *LWT, Food Science and Technology*, 130, 109669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109669>
- [15] Makidon, P. E., Bielinska, A. U., Nigavekar, S. S., Janczak, K. W., Knowlton, J., Scott, A. J., Mank, N., Cao, Z., Rathinavelu, S., Beer, M. R., Wilkinson, J. E., Blanco, L. P., Landers, J. J., & Baker Jr,

- J. R. (2008). Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. *PLoS one*, 3(8), e2954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002954>
- [16] Singh, K. K., & Vingkar, S. K. (2008). Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1-2), 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.035>
- [17] Shah, P., Bhalodia, D., & Shelat, P. (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(1), 24-32. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.59509>
- [18] Xu, C., Gantumur, M. A., Sun, J., Guo, J., Ma, J., Jiang, Z., Wang, W., Zhang, J., Ma, Y., Hou, J., & McClements, D. J. (2024). Design of probiotic delivery systems for targeted release. *Food Hydrocolloids*, 149, 109588. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109588>
- [19] Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057-4061. <https://doi.org/10.1128/AEM.07499-11>
- [20] Oral, N. B., Vatansever, L., Aydin, B. D., Sezer, C., Guven, A., Gumez, M., & Kurkcuglu, M. (2010). Effect of oregano essential oil on biofilms formed by *Staphylococci* and *Escherichia coli*. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(Suppl A), 23-29. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1147>
- [21] Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771-1776. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999>
- [22] Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135-138. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
- [23] Bektaş S., Özdal M., & Gurkok S. (2023). Determination of antibacterial and antibiofilm activities for laurel (*Laurus nobilis* L.) essential oil against the fish pathogen *Pseudomonas* species. *Menba Journal of Fisheries Faculty*, 9(1), 25-33. <https://doi.org/10.58626/menba.1289033>
- [24] Hamouda, T., Hayes, M. M., Cao, Z., Tonda, R., Johnson, K., Wright, D. C., & Baker, J. R. (1999). A novel surfactant nanoemulsion with broadspectrum sporicidal activity against *Bacillus* species. *Journal of Infectious Diseases*, 180(6), 1939-1949. <https://doi.org/10.1086/315124>
- [25] EUCAST 6.0, (2017). Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST, European.
- [26] Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. A., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- [27] Demir, C., & İnanç, B. B. (2015). Investigate nasal colonize *Staphylococcus* species biofilm produced (Nazal kolonize *Stafilokok* türlerinde biyofilm üretiminin araştırılması). *Journal of Clinical Analytical Mmedicine*, 6(4), 414-418. <https://doi.org/10.4328/JCAM.2082>
- [28] O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>

- [29] Diler, Ö., Özil, Ö., Bayrak, H., Yiğit, N. Ö., Özmen, Ö., Saygın, M., & Aslankoç, R. (2021). Effect of dietary supplementation of sumac fruit powder (*Rhus coriaria* L.) on growth performance, serum biochemistry, intestinal morphology and antioxidant capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Animal Feed Science and Technology*, 278, 114993. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114993>
- [30] Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.002>
- [31] Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201-222. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.201-222.1995>
- [32] Pathania, R., Kaushik, R., & Khan, M. A. (2018). Essential oil nanoemulsions and their antimicrobial and food applications. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 6(3), 626-643. <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.3.05>
- [33] Raj, D. S., Dhamodharan, D., Thanigaivel, S., Vickram, A. S., & Byun, H. S. (2022). Nanoemulsion as an effective inhibitor of biofilm-forming bacterial associated drug resistance: an insight into COVID based nosocomial infections. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 27(4), 543-555. <https://dx.doi.org/10.1007/s12257-022-0055-3>
- [34] Shabaaz Begum, J. P., Sahu, P., Vinode, R., Patel, A., Alomary, M. N., Begum, M. Y., Jamous, Y. F., Siddiqua, A., Fatease, A. A., & Ansari, M. A. (2024). Antimicrobial nanoemulsion: A futuristic approach in antibacterial drug delivery system. *Journal of Saudi Chemical Society*, 28(4), 101896. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2024.101896>
- [35] Wei, S., Tian, Q., Zhao, X., Liu, X., Husien, H. M., Liu, M., Bo, R., & Li, J. (2022). Tea tree oil nanoemulsion potentiates antibiotics against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *ACS Infectious Diseases*, 8(8), 1618-1626. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00223>
- [36] Nazıroğlu, M., Diler, Ö., Özil, Ö., & Diler, A. (2022). In vitro antibacterial activity of *Origanum onites* and *Mentha spicata* subs tomentosa essential oil nanoemulsions against bacterial fish pathogens. *Acta Aquatica Turcica*, 18(4), 495-504. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1145109>
- [37] El-Ekiaby, W. T. (2019). Basil oil nanoemulsion formulation and its antimicrobial activity against fish pathogen and enhance disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in cultured Nile tilapia. *Egyptian Journal for Aquaculture*, 9(4), 13-33. <https://doi.org/10.21608/eja.2019.18567.1007>
- [38] Taşar, N., Yazdıcı, F. C., Karaman, A., & Gedik, O. (2023). Antimicrobial activity of essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill and *Pimpinella anisum* L (Apiaceae) species. *International Journal of Innovative Engineering Applications*, 7(1), 119-122. <https://doi.org/10.46460/ijiea.1179593>
- [39] Di Napoli, M., Castagliuolo, G., Badalamenti, N., Maresca, V., Basile, A., Bruno, M., Varcamonti, M., & Zanfardino, A. (2022). Antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant properties of essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. leaves. *Plants*, 11(24), 3573. <https://doi.org/10.3390/plants11243573>
- [40] Çalışkan, U. K., Özçelik, B., Sazlı, A., & Sezik, E. (2010). Comparison of volatile oil from herbalist and cultivar samples of *Foeniculum vulgare* Mill. for their compliance with European pharmacopea and antimicrobial activity. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39(3), 195-210. [https://doi.org/10.1501/Eczfak\\_00000000566](https://doi.org/10.1501/Eczfak_00000000566)

- [41] Williams, V., & Fletcher, M. (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 100-104. <https://doi.org/10.1128/aem.62.1.100-104.1996>
- [42] Characklis, W. G., & Marshall, K. C. (1990). *Biofilms*. Wiley, New York.
- [43] Howell, D., & Behrends, B. (2006). A review of surface roughness in antifouling coatings illustrating the importance of cutoff length. *Biofouling*, 22(6), 401-410. <https://doi.org/10.1080/08927010601035738>
- [44] Cai, W., & Arias, C. R. (2017). Biofilm formation on aquaculture substrates by selected bacterial fish pathogens. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29(2), 95-104. <https://doi.org/10.1080/08997659.2017.1290711>
- [45] Filik, F., & Kubilay, A. (2019). Bazı bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun farklı in vitro metodlarla tespiti. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 378-390. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537796>
- [46] Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
- [47] Zammuto, V., Rizzo, M. G., Spanò, A., Genovese, G., Morabito, M., Spagnuolo, D., Capparucci, F., Gervasi, C., Smeriglio, A., Trombetta, D., Guglielmino, S., Nicolo, M. S., & Gugliandolo, C. (2022). In vitro evaluation of antibiofilm activity of crude extracts from macroalgae against pathogens relevant in aquaculture. *Aquaculture*, 549, 737729. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737729>
- [48] Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- [49] Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M., & Chikindas, M. L. (2017). Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3), e02508-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
- [50] Snoussi, M., Dehmani, A., Noumi, E., Flamini, G., & Papetti, A. (2016). Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. strains. *Microbial Pathogenesis*, 90, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.004>
- [51] da Silva, E. G., Bandeira Junior, G., Cargnelutti, J. F., Santos, R. C. V., Gündel, A., & Baldisserotto, B. (2021). In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of S-(-)-limonene and R-(+)-limonene against fish bacteria. *Fishes*, 6(3), 32. <https://doi.org/10.3390/fishes6030032>
- [52] Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>