

Balık Patojenlerine Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağların Antibakteriyel Aktivitesi

Öznur Görmez^{1,*}, Öznur Diler¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği
Bölümü - Isparta
*oznurgormez@sdu.edu.tr

Geliş tarihi : 12.10.2017, Kabul tarihi : 28.11.2017

ÖZET

Bu araştırmada, Origanum minutiflorum, Artemisia absinthium ve Lonicera periclymenum bitkilerinden elde edilen uçucu yağların GC-MS ile kimyasal bileşenleri ve bazı balık patojenlerine (Aeromonas hydrophila, Yersinia ruckeri ve Lactococcus garvieae) karşı in vitro antibakteriyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. GC-MS analiz sonuçlarına göre, uçucu yağların ana bileşenlerinin O. minutiflorum' da carvacrol (%81.81), A. absinthium' da chrysanthenyl acetate (%41.50) ve L. periclymenum' da linalool (%28.94) olduğu belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre, L. periclymenum bitkisinden elde edilen uçucu yağ dışında, diğer bitkilerden elde edilen uçucu yağların A. hydrophila, Y. ruckeri ve L. garvieae' ye karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Origanum minutiflorum, Artemisia absinthium, Lonicera periclymenum, Antibakteriyel Etki, Uçucu Yağ, Disk Difüzyon Testi, Bakteriyel Balık Patojenleri*

Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Essential Oils Against Fish Pathogens

ABSTRACT

This study was investigated GC-MS chemical analysis and in vitro antibacterial effect of plant essential oils (Origanum minutiflorum, Artemisia absinthium and Lonicera periclymenum) against some fish pathogens (Aeromonas hydrophila, Yersinia ruckeri and Lactococcus garvieae) by disc diffusion test. GC-MS analysis showed the major components of essential oil that carvacrol (%81.81) in O. minutiflorum, chrysanthenyl acetate (%41.50) in A. absinthium and linalool (%28.94) in L. periclymenum. The essential oils except to L. periclymenum that was most antibacterial effect against A. hydrophila, Y. ruckeri ve L. garvieae.

Keywords: *Origanum minutiflorum, Artemisia absinthium, Lonicera periclymenum, Antibacterial Effect, Essential Oil, Disc Diffusion Test, Bacterial Fish Pathogens*

GİRİŞ

Su ürünleri, sağlıklı ve dengeli beslenmede gerekli ve yüksek protein değeri ile önemli bir gıda kaynağıdır. Dünya genelinde tüketilen hayvansal proteinin %17' sini, tüm protein kaynaklarının ise %6.5' ini oluşturmaktadır. Endüstrinin büyümesi ve üretimdeki artışla birlikte kültür koşullarındaki bazı faktörlerden dolayı (yoğunluk, elle müdahale, sıcaklığın ani değişimleri, kötü su ve şartları, stres ve bağışıklığın baskılanması) önemli ekonomik kayıplara

neden olan enfeksiyöz hastalıkların ortaya çıkması söz konusu olmuştur (Naylor ve ark., 2000; Cabello, 2006; Maqsood ve ark., 2011; Reverter ve ark., 2014).

Bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi mikroorganizmalar birçok enfeksiyöz hastalığın ajanıdır ve bu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal bileşenler kullanılmaktadır. Bu bileşenlerin sağlık ve çevre güvenliği üzerine çok sayıda yan etkileri olmasından dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır. Bakteriyel hastalıkların tedavilerinde antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanılmaları ile balık dokularında rezidü oluşabilmekte ve bunun sonucunda antibiyotiğe direçli patojenlerin gelişimi artmaktadır. Ayrıca antibiyotikler balıkta akümüle olmakta ve hem çevre sağlığı hem de tüketici için potansiyel bir risk oluşturmaktadır (Zheng ve ark., 2009; Harikrishnan ve ark., 2010; Okmen ve ark., 2012). Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde hastalıklardan korunmada alternatif arayışlar içerisine girilmiştir.

Tıbbi bitkiler ve onlardan elde edilen uçucu yağların antibakteriyel, antiviral, antifungal, antienflamatuvar, antiseptik, antioksidan, antiparazitik, antitoksijenik ve insektisidal özelliklere sahip olduğu, yapılan çalışmalarda antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmalar üzerinde de etkili oldukları bildirilmiştir (Yiğitarıslan ve ark., 2011; Bayaz, 2014).

Ülkemizde sadece göller yöresinde yayılış gösteren, Dünya kekik pazarında 'Sütçüler kekiği' ve 'Tota kekiği' olarak bilinen, endemik bir tür olan *O. minutiflorum*, Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasında yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda Sütçüler florasından toplanan kekik örneklerinde %1.7-4.9 oranında uçucu yağ bulunduğu, bu yağın en önemli bileşeninin carvacrol (%60.3-92.3) olduğu saptanmıştır (Baydar, 2005). *Origanum* bitkisi uçucu yağlarının antibakteriyel etkisinin yapısında bulunan fenolik bileşenlerce zengin olması nedeniyle güçlü olduğu belirlenmiştir. Özellikle bu bileşenlerden carvacrol' ün hidrofobik karakterde olması sonucunda ilk hedefinin bakteriyel membran olduğu, proton itici gücü etkisiyle de bakteriyel membranı parçaladığı, hem pH gradientini hem de membran boyunca elektron akışını bozarak bu etkiyi gösterdiği sonucuna varılmıştır (Çetinkaya, 2011; Thormar, 2011).

Asteraceae (papatyagiller) familyasında yer alan *A. absinthium* bitkisi halk tarafından pelin, pelin otu, acı pelin, ak pelin, büyük pelin, şeyh harosani, halep harosani, doğu harosani, vermut ve yavşan kökü olarak bilinir. *A. absinthium* üzerine yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda %0.5 oranında, mavimsi yeşil renkli bir uçucu yağ taşıdığı saptanmıştır. Bu uçucu yağın %30-45 oranında thujone içermesi sebebiyle antihelmintik ve insektisidal özellikleri olduğu bildirilmektedir. Uçucu yağa mavi rengini veren bileşiğin seskiterpen yapısında bir azulen olduğu tespit edilmiş olup bundan başka pinen, felladren ve yine seskiterpenlerden kadinen de içerdiği bulunmuştur (Dülger ve ark., 1999; Birinci, 2008).

Caprifoliaceae (Hanımeli) familyasına ait, çalı ve/veya sarmaşık grubundan bir bitki olan *Lonicera* türünün yaklaşık 180 türü vardır, bunun 100 kadarı Çin' dedir. En çok bilinen türleri *Lonicera periclymenum* (Avrupa Hanımelisi), *Lonicera japonica* Thunb. (Japon Hanımelisi, Beyaz Hanımeli) ve *Lonicera sempervirens* (Mercan Hanımelisi, Trompet Hanımelisi)' dir. Kimyasal bileşiminde linalool, germacrene D, α -farnesene bileşenlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Schlotzhauer ve ark., 1996). Türlerin çoğu hoş kokulu, yenilebilir nektar üreten, çan şeklinde çiçeklere sahiptir. Meyvesi çok çekirdekli kırmızı, mavi ya da siyah çitlenbik şeklindedir, çoğu türde meyveleri hafif zehirli olmakla beraber birkaçı (*Lonicera caerulea*) yenilebilir meyvelere sahiptir (Ferguson, 1966). *Lonicera* cinsi bitkilerin antiviral, antibakteriyel, antioksidan ve ani inflamatuvar etkilerinin olduğu bu etkilerinin içeriğindeki flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid gruplarına bağlı olduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2014; Sandigawad, 2015).

Bu çalışmada; gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde enfeksiyöz hastalıklara neden olan *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* bakteriyel patojenlerine

karşı kekik (*Origanum minutiflorum*), pelin otu (*Artemisia absinthium*) ve hanımeli (*Lonicera periclymenum*) bitkilerine ait uçucu yağların *in vitro* antibakteriyel etkileri incelenmiştir.

Materyal Ve Yöntem

Bitki örnekleri

Araştırmada, *Origanum minutiflorum*, *Artemisia absinthium* ve *Lonicera periclymenum* bitki türleri kullanılmıştır. Bu bitkiler, bitki toplama merkezleriyle irtibat kurularak temin edilmiştir. Bitkilerin teşhisleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda yaptırılmıştır.

Bitki materyallerinden uçucu yağ eldesi

Uçucu yağ eldesi için öncelikle bitki örnekleri oda sıcaklığında (25°C) ve yeterli hava sirkülasyonu olan alanlarda kurutulmuşlardır. Kurutulan bitkiler toz haline getirildikten sonra, uçucu yağları hidrodistilasyon yöntemi kullanılarak Clevenger aparatında 100 g bitki örneğinin 2 lt su içinde üç saat süreyle destilasyona tabi tutulması ile elde edilmiştir (Baydar ve ark., 2004).

GC-MS analizi

Uçucu yağların ana bileşenler yönünden kimyasal yapısı Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Araştırma Laboratuvarındaki Gaz kromatografi cihazıyla (GC/MS aparatı kullanılarak) belirlenmiştir.

Bakteriyel balık patojenleri

Antibakteriyel aktivite çalışmalarında kullanılan *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* bakterileri, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları A.B.D. Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Araştırmada, *Y. ruckeri* bakterisine ait 10 adet, *L. garvieae*'ye ait 10 adet ve *A. hydrophila*'ya ait 9 adet olmak üzere toplamda 29 adet bakteri suşu kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Antibakteriyel aktivite çalışmalarında kullanılan bakteri suşları

Suş No	Balık Türü	Köken	Bakteri isimleri
1	Gökkuşığı alabalığı	Denizli (18/1)	<i>Yersinia ruckeri</i>
2	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (15)	<i>Yersinia ruckeri</i>
3	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (17)	<i>Yersinia ruckeri</i>
4	Gökkuşığı alabalığı	Bolu (27)	<i>Yersinia ruckeri</i>
5	Gökkuşığı alabalığı	Manisa (28)	<i>Yersinia ruckeri</i>
6	Gökkuşığı alabalığı	Adapazarı (29)	<i>Yersinia ruckeri</i>
7	Gökkuşığı alabalığı	Denizli (35)	<i>Yersinia ruckeri</i>
8	Gökkuşığı alabalığı	Yalova (36)	<i>Yersinia ruckeri</i>
9	Gökkuşığı alabalığı	İzmir (Yk)	<i>Yersinia ruckeri</i>
10	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (Kb)	<i>Yersinia ruckeri</i>
11	Alabalık	Referans (İngiltere 00/21)	<i>Lactococcus garvieae</i>
12	Gökkuşığı alabalığı	Muğla (M1)	<i>Lactococcus garvieae</i>
13	Alabalık	Referans (ATCC 43921)	<i>Lactococcus garvieae</i>
14	Gökkuşığı alabalığı	Burdur (B1)	<i>Lactococcus garvieae</i>
15	Gökkuşığı alabalığı	Fethiye (F1)	<i>Lactococcus garvieae</i>
16	Gökkuşığı alabalığı	Aydın (A1)	<i>Lactococcus garvieae</i>
17	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (I1)	<i>Lactococcus garvieae</i>
18	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (I2)	<i>Lactococcus garvieae</i>
19	Gökkuşığı alabalığı	İzmir (Lk)	<i>Lactococcus garvieae</i>
20	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (St)	<i>Lactococcus garvieae</i>

21	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (Ka)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
22	Alabalık	Referans (ATCC 7966)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
23	Gökkuşığı alabalığı	Isparta (14)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
24	Gökkuşığı alabalığı	Muğla (16)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
25	Gümüş balığı	Isparta (K001)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
26	Gökkuşığı alabalığı	Muğla (L001)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
27	Levrek	Muğla (MLÇ2)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
28	Levrek	Muğla (MA2)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
29	Çipura	Muğla (MB16)	<i>Aeromonas hydrophila</i>

Antibakteriyal aktivitenin tespiti

O. minutiflorum, *A. absinthium* ve *L. periclymenum* bitkilerine ait uçucu yağların *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi disk difüzyon metodu kullanılarak tespit edilmiştir (Andrews, 2004).

Uçucu yağlar, 1000-0.97 µl/ml konsantrasyon aralıklarında DMSO (Dimetil sülfoksit solüsyonu) ile homojenize edilmiştir. Pozitif kontrol grubunda, standart olarak kullanılan hazır antibiyotik diskleri (*A. hydrophila* için Gentamisin, *Y. ruckeri* için Oksitetrasiklin ve *L. garvieae* için Eritromisin) ve negatif kontrol grubunda ise DMSO kullanılmıştır. Daha sonra bu konsantrasyonlar 6 mm çapında steril disklerle 25 µl emdirilmiştir. Antibakteriyel etkinin belirlenmesinde hazırlanan besiyerleri döküm sıcaklığına geldiğinde, Mc Farland 0.5' e (10^8 cfu/ml) ayarlanan bakteri süspansiyonundan 100 ml besiyerine 100 µl eklenerek döküm yapılmıştır. Dökümden 15-20 dk. sonra besiyerleri üzerine diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. İnkübe edildikten sonra disk etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır. Her bir örnek üç paralel olarak çalışılmıştır. Bakterinin %50' sini inhibe eden değer minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlenmiş ve üremenin olmadığı çaplar antibakteriyel etkiyi göstermiştir (Pirbalouti ve ark., 2010).

İstatiksel analizler

Denemede elde edilen veriler (zon çapı değerleri) SPSS 18.0 paket programında Anova testi ile değerlendirilmiştir (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Denemede incelenen çeşitli parametrelerin önem derecelerini karşılaştırırken sonuçlar ortalama değer ve standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki ayırım varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiş ve önem düzeyi $p < 0.05$ olarak seçilmiştir.

Bulgular

GC-MS analiz sonuçları

Bitki uçucu yağlarının kimyasal analiz sonuçlarına göre, *O. minutiflorum* bitkisi uçucu yağında ana bileşenin fenoliklerden carvacrol (%81.81) olduğu diğer bileşenlerin ise hidrokarbonlardan p-cymene (%5.62), alkaloidlerden borneol (%2.25) ve seskiterpenlerden β-caryophyllene (%1.98) olduğu belirlenmiştir.

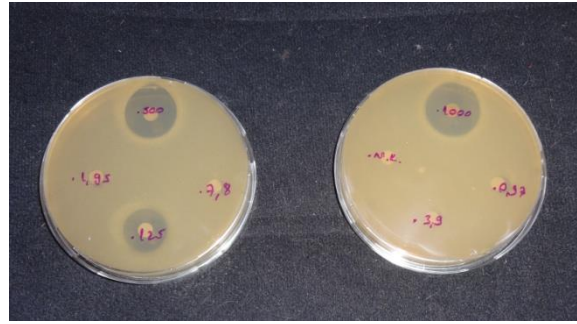
A. absinthium uçucu yağında ise, ana bileşenin monoterpenlerden chrysanthenyl acetate (%41.50), diğer bileşenlerin ise monoterpenlerden sabinol (%15.63), seskiterpenlerden chamazulene (%8.17), monoterpenlerden z and e epoxy-ocimene (%7.74), alkaloidlerden β-myrcene (%3.70), hidrokarbonlardan 1,3-pentadiene, 2-ethyl-4-methyl-1-phenyl-, (e) (%3.29), fenollerden naphthalene, 1,4-dihydro-2,5,8-trimethyl- (%2.53) ve hidrokarbonlardan 1h-indene, 3-ethyl-1-(1-methylethyl) (%2.08) olduğu belirlenmiştir.

L. periclymenum uçucu yağının önemli bileşenlerinin alkaloidlerden linalool (%28.94), fenoliklerden carvacrol (%18.51), alkaloidlerden 2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (z)- (%5.92), esterlerden palmitic acid (%4.90), alkaloidlerden α-terpineol (%4.90), esterlerden methyl palmitate (%4.05), seskiterpenlerden 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (e)-

(%3.48), esterlerden 9,12-octadecadienoic acid (z,z)-, methyl ester (%2.37), hidrokarbonlardan n-tetratetracontane (%2.13) olduğu belirlenmiştir.

Antibakteriyel aktivitenin tespitine dair bulgular

Araştırmada kullanılan *O. minutiflorum* uçucu yağı 1000 µl/ml konsantrasyonda 35.88±12.82 mm zon çapı değeri ile *A. hydrophila* patojeninde en etkili olurken (Şekil 1), aynı konsantrasyonda onu *Y. ruckeri* (25.70±9.07 mm) ve *L. garvieae* (23.00±8.06 mm) patojenleri takip etmiştir. *O. minutiflorum* uçucu yağının her bir patojen için standart olarak kullanılan antibiyotiklere göre bakteri suşları üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür (p<0.05) (Çizelge 2). MIC değerlerinin ise kullanılan 3 farklı bakteri türünün suşlarına göre farklılaştığı, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* için 0.97-31.25 µl/ml aralığında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. *O. minutiflorum* Uçucu Yağının *A. hydrophila*'ya Karşı Antibakteriyel Aktivitesi

A. absinthium uçucu yağı 1000 µl/ml konsantrasyonda 1.73±3.56 mm zon çapı değeri ile *Y. ruckeri* en etkili olurken onu, *A. hydrophila* (1.11±3.21 mm) ve *L. garvieae* (1.03±3.17 mm) takip etmiştir. *A. absinthium* uçucu yağının her bir patojen için standart olarak kullanılan antibiyotiklere göre bakteri suşları üzerinde daha düşük bir etki sağladığı görülmüştür (p<0.05) (Çizelge 2). MİK değerlerinin ise, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* için 31.25 µl/ml, *A. hydrophila* için 62.5 µl/ml olduğu belirlenmiştir.

L. periclymenum uçucu yağında ise test edilen bakteri türlerine karşı herhangi bir antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 2. *O. minutiflorum* ve *A. absinthium* uçucu yağlarının farklı balık patojenlerine karşı antibakteriyel aktivitesi (inhibisyon zon çapı, mm)

	Bakteriler		1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.8	3.9	1.95	0.97	Pozitif kontrol	Negatif kontrol
<i>Origanum minutiflorum</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Ortalama	25.70± 9.07 ^{abc}	24.00± 8.67 ^{ab}	22.90± 7.54 ^{ab}	21.30± 7.99	18.70± 5.05 ^{ab}	14.40± 4.48 ^{bc}	9.10± 5.30 ^{ab}	4.80± 4.98 ^{ab}	3.60± 4.51 ^{ab}	3.10± 3.95 ^{ab}	2.80± 3.61 ^{ab}	20.66± 0.95 ^c	-
		Min	18	15	14	13	13	8	-	-	-	-	-	20	-
		Max	46	45	41	42	32	26	18	12	10	10	10	22	-
	<i>Lactococcus garvieae</i>	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Ortalama	23.00± 8.06 ^{bc}	20.90± 6.26 ^b	21.00± 6.57 ^{ab}	18.50± 5.04	16.70± 3.16 ^b	13.40± 2.89 ^{bc}	4.20± 5.42 ^b	2.10± 4.34 ^b	0.90± 2.75 ^{ab}	0.80± 2.45 ^{ab}	0.70± 2.15 ^{ab}	19.63± 2.20 ^c	-
		Min	15	14	14	13	13	9	-	-	-	-	-	18	-
		Max	41	37	38	32	25	19	15	13	10	9	8	25	-
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Ortalama	35.88± 12.82 ^a	34.22± 11.73 ^a	30.33± 8.92 ^a	25.77± 9.49	20.33± 7.13 ^{ab}	16.22± 5.92 ^{ab}	11.88± 5.84 ^a	8.33± 5.15 ^a	5.11± 4.94 ^a	3.44± 4.06 ^{ab}	3.44± 3.98 ^{ab}	28.11± 5.30 ^{ab}	-
		Min	15	17	17	7	8	6	-	-	-	-	-	19	-
		Max	57	52	47	42	38	28	22	17	14	10	10	36	-
<i>Artemisia absinthium</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Ortalama	1.73± 3.56 ^b	0.90± 2.74 ^b	0.93± 2.89	0.66± 2.03	0.73± 2.24	-	-	-	-	-	-	20.66± 0.95 ^c	-
		Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-
		Max	10	9	11	7	8	-	-	-	-	-	-	22	-
	<i>Lactococcus garvieae</i>	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Ortalama	1.03± 3.17 ^b	1.00± 3.05 ^b	0.80± 2.45	0.83± 2.54	0.70± 2.13	0.66± 2.03	-	-	-	-	-	19.63± 2.20 ^c	-
		Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-
		Max	12	10	9	9	7	7	-	-	-	-	-	25	-
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Ortalama	1.11± 3.21 ^b	1.00± 2.88 ^b	1.03± 3.00	0.88± 2.57	0.88± 2.56	-	-	-	-	-	-	28.11± 5.30 ^{ab}	-
		Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	-
		Max	11	9	10	9	8	-	-	-	-	-	-	36	-

-: İnhibisyon zonu yok

Aynı sütundaki farklı harfler. gruplar arası farkın istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir (p < 0.05).

Tartışma Ve Sonuç

Tıbbi bitkiler geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olup bakteri, virüs, maya ve diğer mantarlara karşı etki göstermektedirler. Bugüne kadar tıbbi bitkilerde farmakolojik etkiye sahip 100.000' den fazla biyoaktif bileşen bulunduğu, bu bileşenlerin bir familya için hatta bir cins veya bir tür için bile spesifik olabildiği bilinmektedir. Bu çalışmada, ülkemiz bitki florasının doğal türlerinden olan *O. minutiflorum*, *A. absinthium* ve *L. periclymenum* tıbbi bitkileri uçucu yağ verim oranları dikkate alınarak çiçekli dönemlerinde toplanmış ve uçucu yağları hidrodistilasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Uçucu yağların kimyasal analizlerinde monoterpen, seskiterpen ve hidrokarbonlara ait farklı bileşenler saptanmıştır. Bu bileşenlerin *O. minutiflorum* bitkisinde fenoliklerde, *A. absinthium* bitkisinde monoterpenlerde, *L. periclymenum* bitkisinde ise alkaloid ve fenoliklerde yoğunlaştığı tespit edilmiştir.

O. minutiflorum bitkisi uçucu yağı üzerine yapılan kimyasal analiz çalışmalarında, Şarer ve ark. (1996) uçucu yağın yüksek oranda carvacrol (%90.78)' den oluştuğunu, diğer bileşenlerin p-cymene (%1.25) ve borneol (%0.38) olduğunu bulmuştur. Bir diğer çalışmada, Baydar (2005), *O. minutiflorum* uçucu yağında ana bileşen olarak carvacrol (%86.5)' ü bulmuş, diğer bileşenlerin ise γ -terpinene (%3.7), p-cymene (%2.7) ve borneol (%2.0) olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada *O. minutiflorum* bitkisi uçucu yağında temel bileşenlerin fenoliklerden carvacrol (%81.81), hidrokarbonlardan p-cymene (%5.62), alkaloidlerden borneol (%2.25) ve seskiterpenlerden β -caryophyllene (%1.98) olduğu, fenollerden thymol bileşeninin ise eser oranda (%0.29) bulunduğu belirlenmiştir. Bulgularımıza göre, *O. minutiflorum* uçucu yağının yüksek oranda carvacrol düşük oranlarda p-cymene ve borneol bileşenlerini içermesi dolayısıyla Şarer ve ark. (1996) ve Baydar (2005) çalışmalarına benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada uçucu yağda thymol bileşeninin eser miktarda da olsa bulunduğu belirlenmiştir.

Artemisia cinsi bitkilerin kimyasal analizi ile ilgili yapılan çalışmalarda terpenoid bileşenleri bakımından zengin olduğu, biyoaktif bileşenlerinin bitkinin bulunduğu bölgeye, hasat zamanına ve çevresel faktörlere göre büyük farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Masotti ve ark., 2003; Erel ve ark., 2012). Altunkaya ve ark. (2014), Türkiye' deki *A. absinthium* bitkisi uçucu yağı üzerinde yaptıkları kimyasal analiz çalışmalarında β -myrcene (%44.32), sabinene (%21.07), β -pinene (%11.77), chamazulene (%6.77), linalool (%6.31) ve thujone (%0.64) bileşenlerini, Diler (2015) ise *A. absinthium* bitkisi ekstraktının terpenoidlerce zengin olduğunu ve temel bileşenlerinin sabinol (%42.22), chrysanthenylacetate (%14.73), epoxy-ocimene (%4.97), thujone (%2.19), d-isothujone (%3.97) olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada ise, *A. absinthium* bitkisi uçucu yağının temel bileşenlerinin monoterpenlerden chrysanthenyl acetate (%41.50), sabinol (%15.63), seskiterpenlerden chamazulene (%8.17), monoterpenlerden z ve e epoxy-ocimene (%7.74) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz bulgular, Altunkaya ve ark. (2014) ve Diler (2015)' in çalışmalarında olduğu gibi uçucu yağın terpenoidlerce zengin olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte *A. absinthium* bitkisi uçucu yağının biyoaktif bileşenlerce çok zengin olduğu, bu bileşenlerin bitkiden bitkiye oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Lonicera cinsi bitkilerin ise flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid gruplarınca zengin olduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2014; Sandigawad, 2015). *L. periclymenum* türünün kimyasal bileşenlerinin analizi ile ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada ise önemli bileşenlerinin alkaloidlerden linalool (%28.94), fenoliklerden carvacrol (%18.51) ve alkaloidlerden 2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (z)- (%5.92) olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla elde ettiğimiz bulgular sonucunda *L. periclymenum* türünün yoğun olarak alkaloid ve fenolik gibi biyoaktif bileşenlerce zengin yapısı dikkati çekmiştir.

Tıbbi bitkilerin antimikrobiyal etkilerini sentezledikleri biyoaktif bileşikleri aracılığıyla gösterdikleri, etkilerinin ise bu bileşenlerin oranlarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Şahin ve ark., 2004).

Balık patojenlerine karşı kimyasal koruyuculara ve antibiyotiklere alternatif olabilmeye potansiyelleri nedeniyle bitki uçucu yağlarının antibakteriyel etkileri ile ilgili günümüze kadar pek çok araştırma yapılmıştır (Öntaş ve ark., 2016; Metin ve ark., 2017).

Öntaş ve ark. (2016), limon kabuğu yağı ve (*Citrus limon* L.) ve argan (*Argania spinosa* L.) yağının *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Listonella anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii* ve *Lactococcus garvieae* bakteriyel balık patojenlerine karşı antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. Yağların özellikle *Y. ruckeri*, *A. hydrophila*, *L. anguillarum* ve *C. freundii* patojenlerinin gelişimini engellediği belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada, karanfil (*Eugenia caryophyllata*), nane (*Menta piperita*) ve lavanta (*Lavandula hybrida*) uçucu yağlarının bakteriyel balık patojenlerinden *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida achromogenes*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalli*, *Vibrio alginolyticus*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Lactococcus garvieae* ve *Vagacoccus salmoninarum*' a karşı *in vitro* antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak karanfil uçucu yağının güçlü antibakteriyel etki gösterdiği, nane ve lavanta yağlarının orta derecede etkili olduğu bulunmuştur (Metin ve ark., 2017).

Çalışmamızda kullandığımız *O. minutiflorum*, *A. absinthium* ve *L. periclymenum* bitkileri ile ilgili yapılan çalışmaların daha çok gıda ve klinik orjinli patojenlere karşı yapıldığı belirlenmiş olup bu bitkilere ait uçucu yağların ilk defa balık patojenlerine karşı antibakteriyel etkisi bu çalışma ile incelenmiştir.

O. minutiflorum, *A. absinthium* ve *L. periclymenum* tıbbi bitkilerine ait uçucu yağların bakteriyel balık patojenlerine (*Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *A. hydrophila*) karşı *in vitro* antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemine göre incelenmiş olup bu patojenlere karşı *L. periclymenum* bitkisi hariç *O. minutiflorum* ve *A. absinthium* uçucu yağlarının antibakteriyel etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonda kullanılan bitkisel uçucu yağlarda doz artışına paralel olarak antibakteriyel etkinin arttığı, en yüksek konsantrasyon olan 1000 µl/ml konsantrasyonda tüm patojenlere karşı en yüksek antibakteriyel aktivitenin görüldüğü tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Aynı zamanda uçucu yağların antibakteriyel etkilerinin bakterilerin türlerine ve aynı tür bakterilerin farklı suşlarına göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

O. minutiflorum bitkisi ile ilgili yapılan çalışmaların endemik bir tür olması nedeniyle sınırlı sayıda kaldığı ve daha çok gıda ve klinik orjinli patojenlere karşı etkisinin çalışıldığı görülmüştür. Altundag ve Aslim (2011), *O. minutiflorum* bitkisine ait uçucu yağın gıda kaynaklı *Xanthomonas vesicatoria* patojenine karşı güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiği, MIC değerinin de 200 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, *Campylobacter* spp. (12 farklı suş *C. jejuni*, 5 farklı suş *C. lari* ve 4 farklı suş *C. coli*) türüne karşı *O. minutiflorum* uçucu yağın 7.8-800 µg/ml ile geniş bir MIC değer aralığında tüm suşlara karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Aslim ve Yucel, 2007). Bu çalışmada ise, *O. minutiflorum* bitkisi uçucu yağında en yüksek etkinin *A. hydrophila* patojenine karşı olduğu onu sırasıyla *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* patojenlerinin takip ettiği belirlenmiştir. *O. minutiflorum* bitkisi uçucu yağının bakteri türlerine karşı dar aralıkta bir MIC değeri (0.97-31.25 µl/ml) ile etkili olması bu bitki türünün bakterilerde gerek tür gerekse suş bazında etkili olduğunu göstermiştir.

A. absinthium bitkisi ile ilgili yapılan çalışmaların daha çok gıda ve klinik orjinli patojenlere karşı yapıldığı ve düşük bir antibakteriyel etkisinin olduğu görülmüştür. Altunkaya ve ark. (2014), *Artemisia absinthium* bitkisi uçucu yağının 6 farklı gıda patojenine (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*,

Enterobacter, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Vibrio* türlerine karşı *A. absinthium* uçucu yağının antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Kordali ve ark., 2005). Bu araştırmalar ışığında çalışmamızda, *A. absinthium* bitkisine ait uçucu yağın ilk defa balık patojenlerine karşı antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Uçucu yağın *Y. ruckeri* patojeninde etkili olduğu onu, *A. hydrophila* ve *L. garvieae* patojenlerinin takip ettiği belirlenmiştir.

Lonicera cinsinde yer alan bitkilerin antimikrobiyal etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Sınırlı sayıdaki bu çalışmalarda bitkinin daha çok ekstraktı tercih edilmiş ve gıda patojenlerine karşı etkisi incelenmiştir. Sandigawad (2015), *Lonicera japonica* bitkisi kloroform, etanol, aseton ve metanol ekstraktlarının farklı bakteri türlerine karşı (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* ve *Salmonella typhi*) antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Tüm ekstraktların çalışılan bakteriler üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Khan ve ark. (2014), *Lonicera lanceolata* bitkisi hekzan, kloroform, etil asetat ve etanol ekstraktının *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* ve *Klebsiella pneumoniae* patojenlerine karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Ekstraktların çalışılan tüm bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda ise *L. periclymenum* bitkisine ait uçucu yağın balık patojenlerine (*Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *A. hydrophila*) karşı herhangi bir antibakteriyel etkisinin olmadığı görülmüştür. Diğer araştırmalar ile mukayese edildiğinde uçucu yağda antibakteriyel etkinin görülmemesi nedeniyle söz konusu bitkide balık patojenleri için ekstrakt formunun incelenebileceği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ülkemiz bitki florasının doğal türlerinden olan *O. minutiflorum*, *A. absinthium* ve *L. periclymenum* bitkilerine ait uçucu yağların ilk defa balık patojenlerine karşı antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Söz konusu bitkilerden *O. minutiflorum* ve *A. absinthium* türlerinin *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* türlerine karşı antibakteriyel etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle *O. minutiflorum* bitkisinin *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* türlerinin neden olduğu bakteriyel hastalıklarda doğal bir tedavi edici olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Gelecekteki çalışmalarda, yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde tıbbi bitkilerin *in vivo* antibakteriyel etkisi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılarak elde edilen sonuçların desteklenmesine ve uygulanmasına gereksinim vardır.

Teşekkür

Çalışmamıza, 4032-D1-14 nolu doktora tez projesi ile destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Altundag, S., Aslim B. (2011). Effect of Some Endemic Plants Essential Oils On Bacterial Spot Of Tomato. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 37-41.
- Altunkaya, A., Yıldırım, B., Ekici, K., Terzioğlu, Ö. (2014). Determining Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of Water Wormwood Extracts. *Gıda*, 39, 17-24.
- Andrews, J.W. (2004). BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method (version 3). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (5), 713-728.
- Aslim, B., Yucel, N. (2007). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil From Endemic *Origanum minutiflorum* On Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, 107, 602-606.
- Bayaz, M. (2014). Esansiyel Yağlar: Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 12(3), 45-53.
- Baydar, H. (2005). Yayla Kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis)' nde Farklı Toplama Zamanlarının Uçucu Yağ İçeriği ve Uçucu Yağ Bileşenleri Üzerine Etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 175-178.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., Karadoğan, T. (2004). Antibacterial Activity and Composition of Essential Oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* Species with Commercial Importance in Turkey. *Food Control*, 15, 169-172.
- Birinci, S. (2008). Doğu Karadeniz Bölgesinde Doğal Olarak Bulunan Faydalı Bitkiler ve Kullanım Alanlarının Araştırılması. *Çukurova Üniv., Fen Bilimleri Enst., Yüksek Lisans Tezi*, 187 s., Adana.
- Cabello, F.C. (2006). Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: A Growing Problem for Human and Animal Health and for the Environment. *Environ. Microbiol.*, 8, 1137-1144.
- Çetinkaya, A. (2011). Timol, Karvakrol, Eugenol ve Alfa Terpineol' un Soğukta Depolanan Vakum Paketlenmiş Hamsi Filetoları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. *Çukurova Üniv., Fen Bilimleri Enst., Doktora Tezi*, 98 s., Adana.
- Diler, Ö. (2015). Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiriciliğinde Görülen Hexamitiosis Enfeksiyonlarının Tedavisinde *Artemisia absinthium* L. ve *Artemisia campestris* L.' in Kullanımı. *Tübitak 1002 Projesi Sonuç Raporu*, 53 s.
- Dülger, B., Ceylan, M., Alitsaous, M., Uğurlu, E. (1999). *Artemisia absinthium* L.(Pelin)' un Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turk. J. Biol.*, 23, 377-384.
- Erel, Ş.B., Reznicek, G., Şenol, S.G., Yavaşoğlu, N.Ü.K., Konyalıoğlu, S., Zeybek, A.U. (2012). Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Artemisia* L. Species From Western Anatolia. *Turkish Journal of Biology*, 36(1), 75-84.
- Ferguson, I.K. (1966). The Genera of Caprifoliaceae in the Southeastern United States. *J. Arnold Arboretum*, 47, 33-59.
- Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Balasundaram, C., Jawahar, S., Heo, M.S. (2010). Identification and Antimicrobial Activity of Combined Extract from *Azadirachta indica* and *Ocimum sanctum*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 62(2), 85-95.
- Khan, A., Nazir, S., Tahir, K., Khan, Z.U.H., Wu, N., Yasmeen, R., Ali, I. (2014). Antimicrobial Assay of Methanolic Crude of *Lonicera lanceolata*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(26), 2534-2539.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. (2005). Determination of The Chemical Composition and Antioxidant Activity of The Essential Oil of *Artemisia dracunculus* and of The Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9452-9458.

- Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M.H., Munir, K. (2011). Emerging Role of Immunostimulants in Combating the Disease Outbreak in Aquaculture. *Int Aquat Res*, 3, 147-163.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessiere, J.M., Viano, J. (2003). Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *J. Agric. Food Chem.*, 3 (51), 7115-7121.
- Metin, S., Didinen, B.I., Mercimek, E.B., Ersoy, A.T. (2017). Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerine Karşı Bazı Bakteriyel Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Aktivitesi. *Yunus Araştırma Bülteni*, 1, 59-69.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M. (2000). Effect of Aquaculture on World Fish Supplies. *Nature*, 405, 1017-1024.
- Okmen, G., Ugur, A., Sarac, N., Arslan, T. (2012). In vivo and in vitro Antibacterial Activities of Some Essential Oils of Lamiaceae Species on *Aeromonas salmonicida* Isolates from Cultured Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(15), 2762-2768.
- Öntaş, C., Baba, E., Kaplaner, E., Küçükaydın, S., Öztürk, M., Ercan, M.D. (2016). Antibacterial Activity of *Citrus limon* Peel Essential Oil and *Argania spinosa* Oil Against Fish Pathogenic Bacteria. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, 22(5), 741-749.
- Pirbalouti, A.G., Malekpoor, F., Enteshari, S., Yousefi, M., Momtaz, H., Hamed, B. (2010). Antibacterial Activity of Some Folklore Medicinal Plants Used by Bakhtiari Tribal in Southwest Iran. *International Journal of Biology*, 2(2), 55.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014). Use of Plant Extracts in Fish Aquaculture as an Alternative to Chemotherapy: Current Status and Future Perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.
- Sandigawad, A.M. (2015). Traditional Applications and Phytochemical Investigations of *Lonicera japonica* Thunb. *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 7(3), 042-049.
- Schlotzhauer, W.S., Pair, S.D., Horvat, R.J. (1996). Volatile Constituents from the Flowers of Japanese Honeysuckle (*Lonicera japonica*). *J. Agric. Food Chem.*, 44, 206-209.
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. (2004). Biological Activities of the Essential Oils and Methanol Extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Food Control*, 15, 549-557.
- Şarer, E., Paçalı, S., Yıldız, S. (1996). *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis Uçucu Yağının Bileşimi ve Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ankara Ecz. Fak. Der.*, 25,1.
- Thormar, H. (2011). *Lipids and Essential oils as Antimicrobial Agents*. Wiley, ISBN: 9780470741788, 203-307.
- Yiğitarıslan, K.D., Azdural, K., Yavuz, U., Turan, F. (2011). Alabalıklarda Fitoterapi Uygulamaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1), 63-68.
- Zheng, Z.L., Tan, J.Y.W., Liu, H.Y. (2009). Evaluation of Oregano Essential Oil (*Origanum heracleoticum* L.) on Growth, Antioxidant Effect and Resistance Against *Aeromonas hydrophila* in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3-4), 214-218.