

Bacillus subtilis ve *Lactobacillus plantarum* Probiyotik Bakterilerinin Bazı Balık Patojenleri Üzerine *in-vitro* Antagonistik Etkisi

Ekrem Şanver ÇELİK, Sebahattin ERGÜN, Sevdan YILMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi

*: <https://orcid.org/0000-0003-4514-457X>, : <https://orcid.org/0000-0003-3685-0691>, : <https://orcid.org/0000-0002-4809-5809>

Received date: 17.07.2019

Accepted date: 10.08.2019

Atf yapmak için: Çelik, E.Ş., Ergün, S.& Yılmaz, S. (2019). *Bacillus subtilis* ve *Lactobacillus plantarum* Probiyotik Bakterilerinin Bazı Balık Patojenleri Üzerine *in-vitro* Antagonistik Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 278-284.

How to cite: Çelik, E.Ş., Ergün, S.& Yılmaz, S. (2019). *In vitro* Antagonistic activity of Probiotic Bacteria *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on Fish Pathogens. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(2), 272-284.

Öz: Bu çalışmada iki potansiyel probiyotik bakteri *Bacillus subtilis* ve *Lactobacillus plantarum*'un bazı balık patojenlerine karşı sıvı kültür inhibisyon testi ile *in-vitro* olarak antagonistik etkisi araştırılmış ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Sıvı kültür inhibisyon testi iki probiyotik türünün üst fazının 36 saatlik kültür sonucunda bazı balık patojenlerinin çoğalmasını inhibe edebildiğini göstermiştir. Test sonuçları *B. Subtilis*'in *A. sobria*, *E. tarda* ve *L. garvieae*'nin inhibisyonunda etkili olduğu; *L. plantarum* probiyotikinin ise *A. sobria*, *L. garvieae*, *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri*'nin büyümesini engellediği tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, probiyotik, balık patojenleri.

In vitro Antagonistic activity of Probiotic Bacteria *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on Fish Pathogens

Abstract: In this study, the antagonistic effect of two potential probiotic bacteria *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* against some fish pathogens by liquid culture inhibition test was investigated and their usability in aquaculture was evaluated. The liquid culture inhibition test showed that the supernatant of the two probiotic species was able to inhibit the proliferation of some fish pathogens after 36 hours of culture. Test results showed that *B. subtilis* was effective in inhibiting *A. sobria*, *E. tarda* and *L. garvieae*; *L. plantarum* probiotic inhibited the growth of *A. sobria*, *L. garvieae*, *L. anguillarum* and *Y. ruckeri*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, probiotic, fish pathogens.

GİRİŞ

Günümüzde birçok alanda yaygın kullanımı olan sentetik kimyasallar veya antibiyotiklerin suya, insan ve hayvan sağlığına olan olumsuz etkileri önemli bir sorundur. Akvakültürde kullanılan sentetik kimyasallar veya antibiyotikler sucul ekosistemi olumsuz etkilemekte ve bakteriyel topluluklarda yapısal değişimlere neden olmaktadır (Martinez, 2008). Ayrıca antibiyotiklere karşı dayanıklı patojenlerin yani bakteriyel direncin oluşması günümüzde balık yetiştiriciliğinde ve insan sağlığı üzerinde önemli sorunlardır (Martinez, 2008; Chelossi vd., 2003). Literatürde yapılan çalışmalara baktığımızda üretimde kullanılan sentetik kimyasallar yerine çevreye dost hangi maddelerin kullanılabileceğinin araştırıldığını görmekteyiz. Örneğin son on yıldır balık yetiştiriciliğinde de antibiyotiklere ve sentetik kimyasallara alternatif olarak probiyotikler, prebiyotikler, bitki ekstraktları, organik asitler vb., çevreye dost ürünlerin etkileri araştırma konusudur (Suzer vd., 2008; Capkin & Altınok, 2009; Ekici vd., 2011; Arıç vd., 2013; Gormez & Diler, 2014; Metin vd., 2015; Dikel, 2015; Koca & Cevikbas, 2015; Uluköy vd., 2017; Gümüş vd., 2017; Diler vd., 2017; Acar, 2018; Büyükeveci vd., 2018; Çelik vd., 2018; Yılmaz & Ergün, 2018; Yılmaz vd., 2018a; 2018b; Kesbiç, 2019; Yılmaz, 2019a; 2019b; Yavuzcan Yıldız vd., 2019; Yılmaz vd., baskıda).

Probiyotikler, konağın intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden, tüketilmeleri sonucunda sindirim sistemine yararlı etkileri ile konağın sağlığında iyileşmeye ve hızlı büyümeye neden olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleri veya bunların metabolitleri olarak tanımlanmaktadır (Gomer Gill vd., 2000; Vine vd., 2006). Uzun yıllardır probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırılması ve olumlu sonuçlar elde edilmesinden sonra, bu günlerde gelinen durum; hayvan sağlığı ve hastalıkların tedavisine yönelik olarak probiyotiklerin etkilerinin araştırılmasıdır. Probiyotikler olarak adlandırılan yararlı bakterilerin insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre üzerinde birçok faydası bulunmaktadır. Örneğin sindirim enzimlerinin aktivitesini arttırmak, bağışıklığı aktive etmek, patojenleri engellemek, büyüme ve yaşama oranını arttırmak, su kalitesini iyileştirmek ve göllerin dibindeki organik çamurda biyolojik bozulmayı gerçekleştirmek gibi avantajlar sağlamaktadırlar (Balcázar vd., 2006; Nimrat vd., 2008; Cerezuela vd., 2011; Utiswannakul vd., 2011; Nimrat vd., 2012).

Bu çalışmadaki amaç; ülkemizde yetiştiriciliği yapılan çiftlik balıklarında çok sık hastalığa neden olan *Listonella anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas* sp., *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter* sp. ve *Lactococcus garvieae* türleri üzerine probiyotik bakterilerin engelleyici etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Çalışmada deneysel bir ortamda (*in-vitro* olarak) iki farklı probiyotik türü (*B. subtilis* ATCC 6633 ve *L. plantarum* BC 7321) kullanılarak balık patojenlerinin üremesi engellenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada antimikrobiyal etkisi araştırılmış olan probiyotik bakteriler *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Lactobacillus plantarum* BC 7321 türleridir. Probiyotik bakterilerden antimikrobiyal üst fazın elde edilmesinde literatürde bildirilen metotlar modifiye edilerek kullanılmıştır (Touraki vd., 2012; Balcázar & Rojas-Luna, 2007; Kongnum & Hongpattarakere, 2012). Bu amaçla *B. subtilis* kültürü Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besi yerini içeren 500 mL erlende 36 °C de 24 saat üretilmiştir. *L. plantarum* kültürü ise 250 mL De Man, Rogosa, and Sharpe Broth (MRS) sıvı besi yerini içeren 500 mL erlende 30°C de 24 saat üretilmiştir. Devamında *B. subtilis* ve *L. plantarum* bakterilerini içeren sıvı besiyerleri steril falkon tüpleri içerisinde birkaç kez 2142 x g de 10 dakika santrifüj (Nüve NF 400) edilmiş ve bakteri kolonilerinin çökmesi sağlanmıştır. Çökme işleminden sonra içerisinde probiyotik bakterilerin üremesi sonucu meydana gelen antimikrobiyal bileşenleri içeren üst fazlar dikkatlice alınarak önce 0.45-µm ve sonra 0.22 µm millipor filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Probiyotik bakterilerin üretilmesiyle elde edilen bu üst fazların asidik özellik gösterdiği bilinmektedir (Schoster vd., 2013). Bu nedenle çalışmada üst fazların patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal etkileri, pH nötrülemesi yapılarak araştırılmıştır. pH nötrülemesinin de literatürde bildirildiği gibi 5N sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmış ve üst fazların pH sı her iki probiyotik türü içinde 6.8 olarak ayarlanmıştır (Kongnum & Hongpattarakere, 2012).

Balık patojenleri üzerine *B. subtilis* ve *L. plantarum* probiyotik bakterilerinden elde edilen üst fazın antimikrobiyal etkisini tespit etmek için yaygın kullanımı olan sıvı kültür inhibisyon testi uygulanmıştır. Çalışmada kullanılmış olan balık patojenlerinin inkübasyon ortamları ve süreleri Tablo 1’de verilmiştir (CLSI, 2005; Miller, 2003).

Tablo 1. Çalışmada kullanılmış olan balık patojenleri.

Patojen Bakteri Türü	Balık Türü	Besi Ortamı	Üreme Sıcaklığı
<i>L. anguillarum</i> , SY-L24	<i>Dicentrarchus labrax</i>	MH,TS*	24
<i>L. garvieae</i> , SY-LG1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MH,TS	24
<i>E. tarda</i> , SY-ED1	<i>Oreochromis niloticus</i>	MH,TS	28
<i>A. sobria</i> , SY-AS1	<i>Cyprinus carpio</i>	MH,TS	28
<i>Citrobacter</i> sp., SY-C10	<i>Oreochromis niloticus</i>	MH,TS	28
<i>Y. ruckeri</i> , E42	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MH,TS	22

L. anguillarum=*Listonella anguillarum*; *L. garvieae*=*Lactococcus garvieae*; *E. tarda*=*Edwardsiella tarda*; *A. sobria*= *Aeromonas sobria*; *Y. ruckeri*= *Yersinia ruckeri*.

* Besi yeri tuz oranı %1,5 olarak ayarlanmıştır.

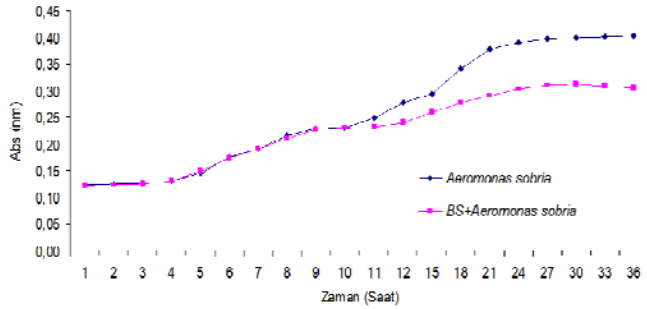
Sıvı kültür inhibisyon testi için literatürde bildirilen 96 çukur plakada yapılan standart metotlar kullanılmıştır (Kongnum & Hongpattarakere, 2012; Nakayama vd., 2009; Khouiti & Simon, 1997). Test için balık patojenleri Tablo 1’de verilen uygun sıcaklık ve sıvı besiyerlerinde üretilmiş (CLSI, 2005, Miller, 2003) yoğunlukları 1 X 10⁶ CFU/mL olarak ayarlanmıştır (Kongnum & Hongpattarakere, 2012).

Devamında her iki probiyotik bakterisinin üst fazlarından plakalara 40 µl konmuş ve üzerine yoğunluğu 1×10^6 CFU/mL olarak ayarlanmış balık patojenlerini içeren sıvı besiyerlerinden 160 µl ilave edilmiş ve 600 nm dalga boyunda okumalar yapılmıştır. Plakalar patojen bakterilerin üremesi için uygun sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Okumalar mikropkaya okuyucuda (Marka model eklenmeli) 36 saatte süresince yapılmıştır. Elde edilen okuma sonuçları ile çizilecek grafiklerden probiyotik bakterilerin üst fazının balık patojenleri üzerindeki engelleyici etkisi ölçülmüştür.

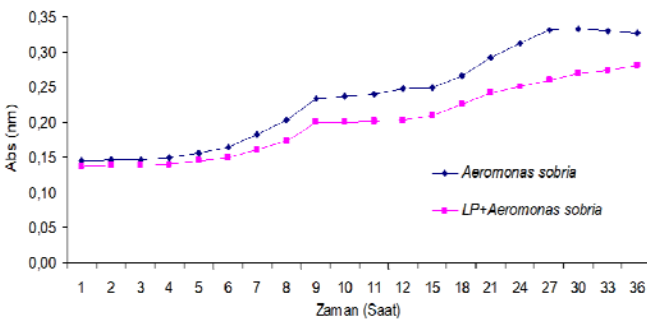
Sıvı kültür inhibisyon testi için denemeler 3 tekrarlı yürütülmüştür (n=3). Bu amaçla her bir bakteri için 96 çukur plakada 3 adet çukur kullanılmıştır. *B. subtilis* ve *L. plantarum* üst fazlarının etkilerinin verileri arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi amacıyla Varyans analizleri ile gruplar arası farklar SPSS 19 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

A. sobria üzerine probiyotik üst fazlarının etkisine baktığımızda her iki probiyotik türünde *A. sobria* patojen bakterisinin üremesini engelleyici etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1 ve 2).

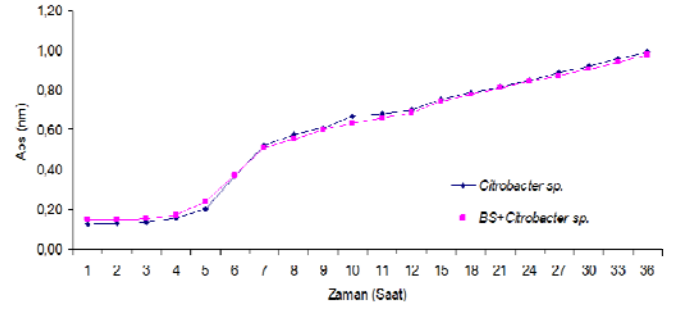


Şekil 1. *Bacillus subtilis* (BS)'in *Aeromonas sobria* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

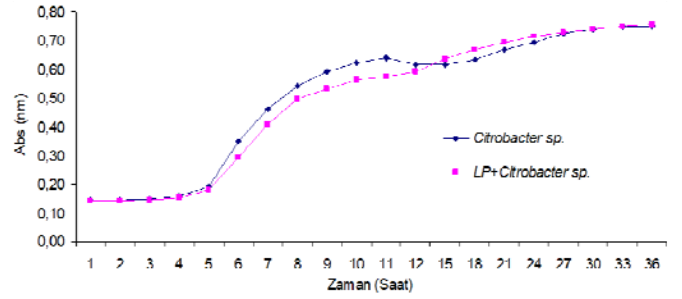


Şekil 2. *Lactobacillus plantarum* (LP)'in *Aeromonas sobria* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

Citrobacter sp. patojeni üzerine *B. subtilis* üst fazının herhangi bir etkisi yokken (Şekil 3), *L. plantarum* üst fazının sadece 10 ve 11. saatlerde *Citrobacter sp.* patojeninin üremesini engellediği bulunmuştur (Şekil 4).

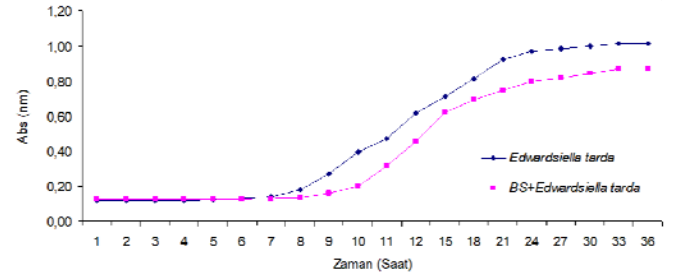


Şekil 3. *Bacillus subtilis* (BS)'in *Citrobacter sp.* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

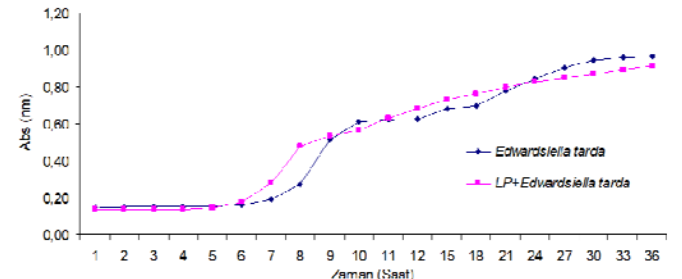


Şekil 4. *Lactobacillus plantarum* (LP)'in *Citrobacter sp.* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

B. subtilis üst fazının 9. saatten itibaren *E. tarda* bakterisinin üremesini önemli oranda engellediği tespit edilmiştir (Şekil 5). Ancak *L. plantarum* üst fazının *E. tarda* patojeni üzerinde herhangi bir engelleyici etkisi görülmemiştir (Şekil 6).

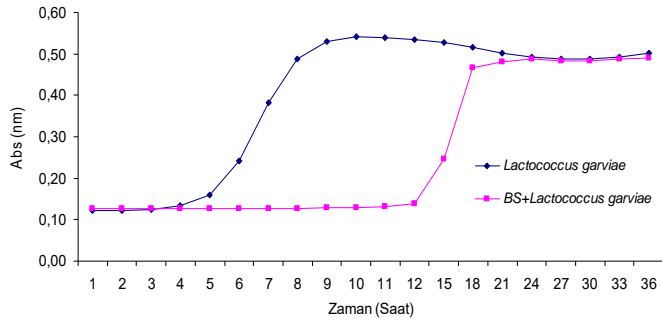


Şekil 5. *Bacillus subtilis* (BS)'in *Edwardsiella tarda* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

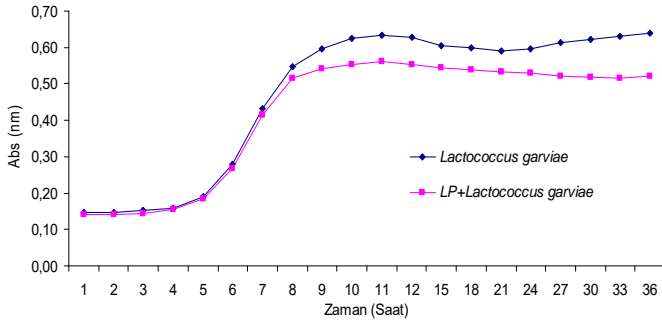


Şekil 6. *Lactobacillus plantarum* (LP)'in *Edwardsiella tarda* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

B. subtilis üst fazının 6-15. saatler arasında *L. garvieae* bakterisinin üremesini önemli oranda engellediği tespit edilmiştir (Şekil 7). *L. plantarum* üst fazının ise *L. garvieae* bakterisinin üremesini 9. saatten itibaren engellediği belirlenmiştir (Şekil 8).

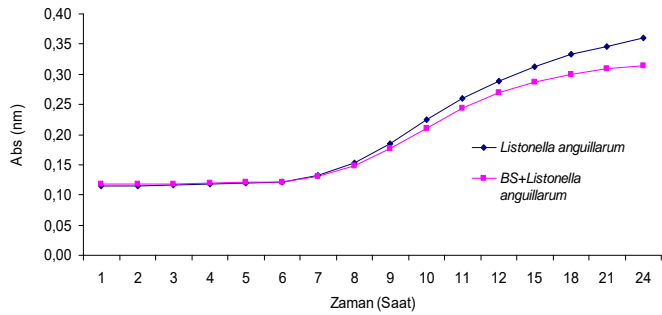


Şekil 7. *Bacillus subtilis* (BS)'in *Lactococcus garvieae* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

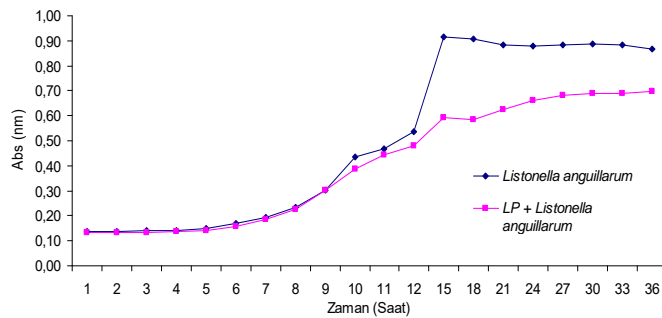


Şekil 8. *Lactobacillus plantarum* (LP)'in *Lactococcus garvieae* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

L. anguillarum bakterisi üzerine *B. subtilis* üst fazının engelleyici etkisinin olmadığı bulunurken (Şekil 9), *L. plantarum* üst fazının 15. saatten itibaren *L. anguillarum* bakterisinin üremesini engellediği görülmüştür (Şekil 10).



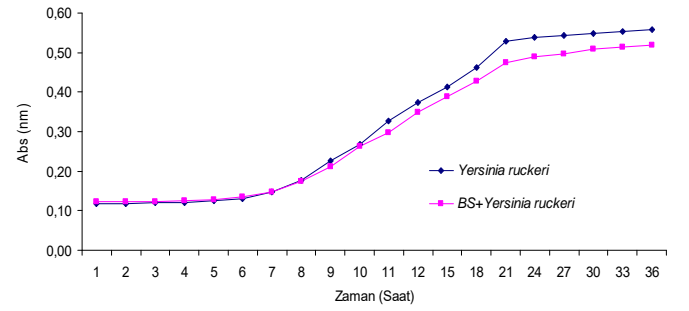
Şekil 9. *Bacillus subtilis* (BS)'in *Listonella anguillarum* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.



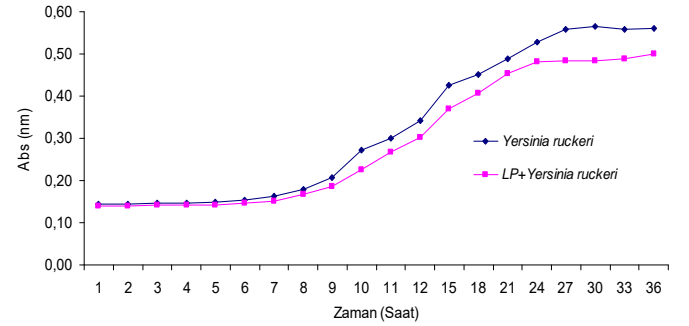
Şekil 10. *Lactobacillus plantarum* (LP)'in *Listonella anguillarum* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

B. subtilis üst fazının *Y. ruckeri* bakterisi üzerine engelleyici etkisi görülmezken (Şekil 11), *L. plantarum* üst

fazının 27. saatten itibaren *Y. ruckeri* bakterisinin üremesini engellediği görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 11. *Bacillus subtilis* (BS)'in *Yersinia ruckeri* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.



Şekil 12. *Lactobacillus plantarum* (LP)'in *Yersinia ruckeri* bakterisinin üremesi üzerine etkisi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışma sonucunda *B. subtilis* üst fazının *A. sobria*, *E. tarda* ve *L. garvieae* bakterilerinin üremesini engellediği, *L. plantarum* üst fazının ise *A. sobria*, *L. garvieae*, *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* patojenleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Daha önce *L. plantarum* MRO3.12 üst fazının *V. harveyi*'nin üremesi üzerinde güçlü engelleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kongnum & Hongpattarakere, 2012). Farklı bir çalışmada *Vibrio* (=Listonella) *anguillarum* 332A serotype O2 patojeni üzerine *B. subtilis* NCIMB 3610 ve *L. plantarum* CECT 220 üst fazlarının engelleyici etki gösterdiği ve *B. subtilis*'in daha etkili olduğu bildirilmiştir (Touraki vd., 2012). Ancak bu çalışmada *B. subtilis*'in aynı patojen üzerinde etkili olmaması hem probiyotik hemde patojen suşlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

B. subtilis üst fazının balık patojenleri üzerindeki etkileriyle ilgili yapılan diğer çalışmalara baktığımızda *B. subtilis* UTM 126 probiyotik bakterisinin *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* ve *V. parahaemolyticus* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Balcazar & Rojas-Luna 2007). Benzer bir çalışmada *B. subtilis* BT23 üst fazının *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* ve *V. damsela* bakterileri üzerinde antagonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Vaseeharan & Ramasamy, 2003). Ancak çalışmamızda *B. subtilis* üst fazının *L. anguillarum* üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni suş farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Bu hipotezi doğrular nitelikte olan

farklı bir çalışmada *B. subtilis* BS üs fazının dört farklı *V. harveyi* (Thailand, Philippines, IFO 15634 ve LMG 4044) suşu üzerine antagonistik etkileri araştırılmış ve sadece *V. harveyi* LMG 4044 suşu üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Nakayama vd., 2009). Aynı çalışmada sıvı kültür inhibisyon testinde *B. subtilis* BS üs fazının IFO 15634 suşunun üremesini etkilemediği, ancak Thailand, Philippines ve LMG 4044 izolatlarının üremesini engellediği bulunmuştur. *B. subtilis* E20 üs fazının *Vibrio parahemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Lactococcus garvieae*, *Debaryomyces hansenii*, *Photobacteria damsela*, *Streptococcus sp.*, ve *Aeromonas hydrophila* patojenleri üzerine etkilerinin araştırıldığı farklı bir çalışmada disk difüzyon testi sonucunda sadece *A. hydrophila* üzerinde engelleyici etki tespit edilmiştir (Tseng vd., 2009). Çalışmamızda ise *B. subtilis* üs fazının *L. garvieae* bakterilerinin üremesini engellediği bulunmuştur.

Yapılan çalışmalara bakıldığında elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların farklı suşların kullanılmış olması yanı sıra engelleyici etkinin belirlenmesinde kullanılan farklı testlerden de kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışma sonucunda *B. subtilis* üst fazının *A. sobria*, *E. tarda* ve *L. garvieae* bakterilerinin, *L. plantarum* üst fazının ise *A. sobria*, *L. garvieae*, *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* bakterilerinin üremesini engellediği belirlenmiştir. İleriki çalışmalarda *Bacillus subtilis* ve *Lactobacillus plantarum* probiyotik bakterilerinin balık yemlerine ilave edilerek besleme çalışmalarının yapılmasına ve bu çalışmada test edilen patojenlere karşı balıkların direnç kazanımlarının araştırılmasına ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2016-779 no'lu proje ile desteklenmiştir. Ayrıca proje süresince laboratuvar çalışmalarında bizden yardımlarını esirgemeyen Samet ALKAN ve Çağatay BAYİZİT'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

Acar, Ü. (2018). Effects of diet supplemented with ethanolic extract of propolis on growth performance, hematological and serum biochemical parameters and disease resistance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, **495**, 339-344.

Arıç, N., Suzer, C., Gökvardar, A., Başaran, F., Çoban, D., Yıldırım, Ş., Kamacı, H.O., Fırat, K. & Saka, Ş. (2013). Effects of probiotic (*Bacillus sp.*) supplementation during larval development of

Gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Turk J Fish Aquat Sci*, **13**(3), 407-414.

- Balcázar, J.L., Blas, I.D., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Múzquiz, J.L. (2006).** The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol*, **114**, 173-186.
- Balcázar, J.L. & Rojas-Luna, T. (2007).** Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Microbiol*, **55**, 409-412.
- Büyükdıveci, M.E., Balcázar, J.L., Demirkale, İ. & Dikel, S. (2018).** Effects of garlic-supplemented diet on growth performance and intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **486**, 170-174.
- Capkin, E. & Altınok, I. (2009).** Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J Appl Microbiol*, **106**(4), 1147-1153.
- Cerezuela, R., Meseguer, J. & Esteban, M.A. (2011).** Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *J Aquaculture Res Dev*, **S1**, 008.
- Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G. & Banat I.M. (2003).** Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*, **219**, 83-97.
- CLSI, (2005).** Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline. CLSI document M42-P [ISBN 1-56238-576-3]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
- Çelik, E.Ş., Ergün, S. & Yılmaz, S. (2018).** The effects of dietary probiotic and antibiotic supplementations on health characteristics of rainbow trout. *TURJAF*, **6**(9), 1184-1190.
- Dikel, S. (2015).** The use of garlic (*Allium sativum*) as a growth promoter in aquaculture. *TURJAF*, **3**(7), 529-536.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I. & Metin, S. (2017).** Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutr*, **23**(4), 844-851.
- Ekici, S., Diler, Ö., Didinen, B.I. & Kubilay, A. (2011).** Antibacterial activity of essential oils from medicinal plants against bacterial fish pathogens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **17**(Supplement A), 47-54.

- Gomez-Gill, B., Roque, A. & Turnbull, J.F. (2000).** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, **191**, 259-270.
- Gormez, O. & Diler, O. (2014).** In vitro antifungal activity of essential oils from Tymbra, Origanum, Satureja species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Aquaculture Res*, **45**(7), 1196-1201.
- Gümüş, E., Kubilay, A., Guney, Ş., Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Metin, S. & Ulukoy, G. (2017).** Effect of dietary kefir on the growth performance, feed utilization and fatty acid profile of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutr*, **23**(5), 964-972.
- Kesbiç, O.S. (2019).** Effects of juniper berry oil on growth performance and blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, **50**(1), 342-349.
- Khouti, Z. & Simon, J.P. (1997).** Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* 213. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **19**, 28-33.
- Koca, S.B. & Cevikbas, M. (2015).** Antifungal effect of *Origanum onites* essential oil as an alternative to formalin in the artificial incubation of narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Aquaculture Res*, **46**(9), 2204-2210.
- Kongnum, K. & Hongpattarakere, T. (2012).** Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immun*, **32**, 170-177.
- Martinez, J.L. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, **321**, 365-367.
- Metin, S., Diler, O., Didinen, B.I., Terzioglu, S. & Gormez, O. (2015).** In vitro and in vivo antifungal activity of *Satureja cuneifolia* ten essential oil on *Saprolegnia parasitica* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) eggs. *Aquaculture Res*, **46**(6), 1396-1402.
- Miller, R.A., Walker, R.D., Baya, A., Clemens, K., Coles, M., Hawke, J.P. & Reimschuessel, R. (2003).** Antimicrobial susceptibility testing of aquatic bacteria: quality control disk diffusion ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28°C. *J Clin Microbiol*, **41**, 4318-4323.
- Nakayama, T., Lu, H. & Nomura, N. (2009).** Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Lett Appl Microbiol*, **49**, 679-684.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P. & Vuthiphandchai, V. (2008).** Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, **285**, 123-129.
- Schooster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P.D., Dal Bello, F. & Guardabassi, L. (2013).** In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe*, **20**, 36-41.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, Ş., Firat, K., Otguçuoğlu, Ö. & Küçüksari, H. (2008).** *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, **280**, 140-145.
- Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P. & Karamanoli, C. (2012).** Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World J Microbiol Biotechnol*, **28**, 2425-2433.
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S. & Liu, C.H. (2009).** Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immun*, **26**(2), 339-344.
- Uluköy, G., Metin, S., Kubilay, A., Güney, Ş., Yıldırım, P., Güzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T. & Gümüş, E. (2017).** The effect of kefir as a dietary supplement on nonspecific immune response and disease resistance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). *J World Aquaculture Soc*, **48**(2), 248-256.
- Utiswannahkul, P., Sangchai, S. & Rengpipat, S. (2011).** Enhanced growth of black tiger shrimp *Penaeus monodon* by dietary supplementation with *Bacillus* (BP11) as a probiotic. *J Aquaculture Res Dev*, **51**, 006.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. & Kaiser, H. (2006).** Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews*, **30**, 404-427.
- Yavuzcan Yildiz, H., Phan Van, Q., Parisi, G. & Dam Sao, M. (2019).** Anti-parasitic activity of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) juice against crustacean parasite, *Lernantropus kroyeri*, found on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Ital J Anim Sci*, **18**(1), 833-837.
- Yılmaz, S., Ergun, S., Şanver Çelik, E., Yigit, M. & Bayizit, C. (Baskıda).** Dietary trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss*): II. Effect on antioxidant status, digestive enzyme, blood biochemistry and liver antioxidant gene expression responses. *Aquaculture Nutr*, <https://doi.org/10.1111/anu.12935>.
- Yılmaz, S. (2019a).** Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. *Fish Shellfish Immun*, **84**, 1125-1133.
- Yılmaz, S. (2019b).** Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. *Fish Shellfish Immun*, **86**, 384-392.
- Yılmaz, S. & Ergün, S. (2018).** Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish Shellfish Immun*, **78**, 140-157.
- Yılmaz, S., Ergün, S. & Yığıt, M. (2018).** Effects of dietary FARMARIN® XP supplement on immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **496**, 211-220.
- Yılmaz, S., Ergun, S., Çelik, E. Ş. & Yigit, M. (2018).** Effects of dietary humic acid on growth performance, haemato-immunological and physiological responses and resistance of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture Res*, **49**(10), 3338-3349.
- Yılmaz, S., Ergün, S. & Çelik, E.Ş. (2018).** The effect of dietary carob (*Ceratonia siliqua*) syrup on growth performance, haematological, serum biochemical and immunological parameters in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *TURJAF*, **6**(12), 1820-1826.

***Corresponding author's:**

Prof. Dr. Ekrem Şanver ÇELİK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Çanakkale, Türkiye.

✉E-mail: sanver_celik@comu.edu.tr

ORCID: