

***Lactococcus garvieae* ve *Vibrio anguillarum* Balık Patojenlerine Karşı Bazı Bitkisel Yağların *In Vitro* Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi**

Pınar YILDIRIM^{1*}, Aytegin KUB LAY¹, Aydin GÜNEY¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Etiler Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü Çünür/ISPARTA

* Sorumlu yazar: Tel:0246 211 86 61;; Faks:0 246 211 86 61
e-posta: yildirimpinar06@gmail.com

Geliştirme Tarihi: 12.06.2013
Kabul Tarihi: 15.07.2013

Abstract

Determination of *In Vitro* Antibacterial Activity of Some Vegetable Oils for Fish Pathogens *Vibrio anguillarum* and *Lactococcus garvieae*

In this study, plant oils of *Hypericum perforatum*, *Sesamum indicum*, *Nigella sativa* were investigated for their *in vitro* antibacterial activity against *Vibrio anguillarum* and *Lactococcus garvieae*. Antibacterial activity was found to show with oil of *Nigella sativa*. It was determined formed on the diameter of inhibition (inhibition zone: 18 mm) of the oil against *Vibrio anguillarum* and *Lactococcus garvieae* pathogens. Plant oils of *Hypericum perforatum*, *Sesamum indicum* were not found the antibacterial effect against the bacterial fish pathogens. Antibacterial and immunostimulant feature of this plant is known to be therapeutic for human health in many disease also we were found to be effective against fish pathogens. As a result of the studies, *Nigella sativa* oil were determined to be potentially be used in treatment against vibriosis and lactococcosis.

Keywords: *Nigella sativa*, medicinal plants, antibacterial activity, agar well diffusion.

Özet

Bu çalışmada kantaron (*Hypericum perforatum*), susam (*Sesamum indicum*) ve çörekotu (*Nigella sativa*) bitkisel yağlarının balık patojeni bakteri türlerinden; *Vibrio anguillarum* ve *Lactococcus garvieae* üzerinde *in vitro* ortamda saf konsantrasyonu kullanılarak antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Çörekotu yağının *Vibrio anguillarum* ve *Lactococcus garvieae* patojenleri üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. Kantaron ve susam yağlarının araştırmada kullanılan bakteriyel balık patojenleri üzerinde antibakteriyel etkisi görülmemiştir. Antibakteriyel ve immunostimulant özelliği ile insan sağlığı için birçok hastalığı iyileştiren bu bitkinin balık patojenlerine karşı da etkili olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada çörekotu yağının *Vibrio anguillarum* ve *Lactococcus garvieae*'nin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Nigella sativa*, tıbbi bitkiler, antibakteriyel aktivite, agar well diffüzyon.

Giriş

Son yıllarda patojen mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan kimyasal ve sentetik maddelerin güvenli olup olmadığı konusundaki kaygılar ve patojenlerin direnç kazanması, araştırmacıları doğal yolla elde

edilen bitki ekstraktlarının kullanımına yönlendirmiştir. Ayrıca kullanılan kimyasalların kanserojenik özelliğe sahip olmaları ve rezidü sorunları endüstriyelere yol açmaktadır.

Bununla birlikte antibiyoti e dirençli mikroorganizmaların neden oldu u hastalık oranındaki ciddi artı , yeni do al antimikrobiyal bile enlerin ke fi üzerindeki ara tırmaları da arttırmı tır (Cerit, 2008).

Çörekotu ya ı içeri inde bulundurdu u ya asitlerinin yanı sıra, yüksek oranda bulunan timokinon, p-simen ve karvakrol bile imlerinin antibakteriyel etki gösterdi i tespit edilmi tir (Ali ve Blunden, 2003). Kantaron ya ında bulunan hiperforin maddesinin Gram-pozitif bakterilerde antimikrobiyal etki gösterdi i bulunmu tur (Cecchini vd., 2007). Susam ya ı sesamin adı verilen etkin madde sahiptir ve ba ı lık sistemini güçlendirdi i bilinmektedir. Susam ya ının Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar ile Mayalara kar ı in vitro antimikrobiyal aktivitesi incelenmi , *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* üzerinde önleyici bir etki gösterdi i bulunmu tur (Shittu vd., 2007).

Bu ara tırmada çörekotu, susam ve kantaron ticari bitkisel ya larının balık patojeni bakterilerden *L. garvieae* (11 su), *Vanguillarum* (3 su) su larına kar ı antibakteriyel etkisinin *in vitro* olarak belirlenmesi amaçlanmı tır.

Materyal ve Metot

Bitkisel Ya lar

Çalı mada, kantaron (*Hypericum perforatum*), susam (*Sesamum indicum*) ve çörekotu (*Nigella sativa*) bitkilerinin ya ları kullanılmı tır. Bitkisel ya lar, ticari olarak kullanılan ürünleri içermektedir.

Bitkisel ya lardan çörekotu (*N. sativa*) bitkisinin kimyasal bile enleri ürünü almı oldu umuz Akdeniz Do al Tar. Ür. Gıda n . Tur. San. Tic. Ltd. ti. (GEBECE) firması tarafından Mustafa Kemal Üniversitesi Teknoloji ve AR-GE Uygulama ve Ara tırma Merkezi Müdürlü ü'ne yaptırılmı tır. Çörek otunun gaz

kromatografisi ile yapılan analiz sonuçları tablo 1 de verilmi tir.

Tablo 1: Çörek otu ya ının ya asitleri bile enleri

Bile en	%
Pamitik asit	14,78
Oleik asit	30,88
Linoleik asit	50,14
Linolenik asit	0,37
Gadoleik asit	0,80
Eicosadionoik asit	3,04

Ara tırmada Kullanılan Bakteriyel Balık Patojenleri

Ara tırmada, levreklerden izole edilen ve stanbul orijinli 1 *V. anguillarum* izolatu (izolat no: 12); alabalıklardan izole edilen ve Fethiye orijinli 2 *V. anguillarum* izolatu (izolatno: 13-14) ve alabalıklardan izole edilen ve Denizli orijinli 11 *L. garvieae* (izolatno: 1-11) izolatu kullanılmı tır. Bu bakteri su ları; fakültemize, te his için getirilen hasta balıklardan izole edilen su lardır.

Antibakteriyel Aktivenin Tesbiti

Bitkisel ya ların antibakteriyel etkileri agar well diffüzyon metodu (NCCLS,1993) ile saptanmı tır. Bitkisel ya ların ticari saf konsantrasyonları kullanılmı tır. Ayrıca pozitif kontrol olarak gentamisin ve ciprofloksisin ticari antibiyotik diskleri kullanılmı tır. Antibakteriyel etkinin belirlenmesinde, *L. garvieae* su ları için Tryptic Soy Agar (TSA), *V. anguillarum* su ları için %2 tuz ilavesi yapılmı TSA hazırlanmı tır. Hazırlanan besiyerleri döküm sıcaklı ına geldi inde, McFarland 0,5'e ayarlanan bakteri süspansiyonları eklenerek döküm yapılmı tır. Dökümden 15-20 dakika sonra besiyerleri üzerinde 3 mm çapında çukurlar açılmı ve bu çukurlara 35 µl her bitkinin ya ı saf ilave edilmi tir.

Bakteriler 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmü tür.

Bulgular

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Agar Well Diffüzyon Testi Sonuçları

Bu çalı mada kullanılan 3 farklı (çörekotu, susam, kantaron) bitkisel ya dan çörekotu ya ının saf konsantrasyonun *L. garvieae* ve *V.*

anguillarum su larına kar ı etkili oldu u görülmü tür.

Di er bitkisel ya lar olan susam ve kantaron ya larının patojen bakteriler üzerine etkisi görülmemi tir (Tablo 2). Ticari antibiyotik diskleri ile yapılan pozitif kontrolde *L. garvieae* su ları gentamisine kar ı duyarlı oldukları tespit edilmi tir. *V. anguillarum* su larına kar ı ciprofloksisin duyarlı oldu u tespit edilmi tir.

Tablo 2. Çörekotu, susam ve kantaron ya larının *L.garvieae* ve *V.anguillarum*'akar ı antibakteriyel aktivitesi (inhibisyonzon çapı, mm)

Patojen Suşlar	Çörekotu (<i>Nigellasative</i>)	Susam (<i>Sesamumindicum</i>)	Kantaron (<i>Hypericumperforatum</i>)
<i>L.garvieae</i> (L1)	-	-	-
<i>L.garvieae</i> (L2)	11 mm	-	-
<i>L.garvieae</i> (L3)	16 mm	-	-
<i>L.garvieae</i> (L4)	-	-	-
<i>L.garvieae</i> (L5)	10 mm	-	-
<i>L.garvieae</i> (L6)	10 mm	-	-
<i>L.garvieae</i> (L7)	8 mm	-	-
<i>L.garvieae</i> (L8)	7 mm	-	-
<i>L.garvieae</i> (L9)	-	-	-
<i>L.garvieae</i> (L10)	-	-	-
<i>L.garvieae</i> (L11)	18 mm	-	-
<i>V. anguillarum</i> (V12)	18 mm	-	-
<i>V. anguillarum</i> (V13)	11 mm	-	-
<i>V. anguillarum</i> (V14)	-	-	-

- : Antibakteriyel etki saptanmadı, Ampisilin>17 mm duyarlı (S), Ciprofloksisin >21 mm duyalı (S).

Tartı ma ve Sonuç

Bu ara tırmada antibiyotiklerin yerine geçebilecek tıbbi özellikleri olan bitkilerin alternatif tedavi olanakları için ön çalı ma olu turması hedeflenmi tir. Çalı mada kantaron (*H. perforatum*), susam (*S. indicum*)

ve çörekotu (*N. sative*) bitkisel ya larının balık patojeni bakteri türlerinden; *V. anguillarum* ve *L. garvieae* üzerinde *in vitro* ortamda antibakteriyel etkisi incelenmi tir. nceleme sonucunda çörekotu ya ının her iki patojen üzerinde etkili sonuç gösterdi i tespit edilmi tir.

nhibisyon zonu 15 mm'den büyük olursa kuvvetli, 8-15mm arası orta ve 1-8mm arası zayıf aktivite olarak değerlendirilmiştir (Bansemir vd, 2006). Buna göre; çörekotu yağı *L. garvieae* su larından iki tanesine kuvvetli (L3, L11), dördüne orta (L2, L5, L6, L7) derecede etki etmiş ve diğer beş su a karşı etki göstermemiştir. Ara tırmada kullanılan *V. anguillarum* su larından 12 nolu su a karşı kuvvetli, 13 nolu su a orta derecede etki gösterirken, 14 nolu su a karşı etki etmemiştir.

Çörekotu yağı içerdiği esansiyel yağlarla bağımlılık sistemini dengelediği belirtilen, birçok biyoaktif özellikleri de antibakteriyel (Arici vd, 2005; Akgul, 1989; Hanafy ve Hatem, 1991; Farrag vd., 2000), antifungal (Akgul, 1989; Khan vd., 2003) ve antioksidan (Burits ve Bucar, 2000) etkileri çeşitli ara tırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Burits ve Bucar (2000) ve Ali ve Blunden, (2003) yaptıkları çalışmalarda çörekotunun içeriğinde yüksek oranda timokinon, p-simen ve karvakrol bileşimlerinin bulunduğunu ve bütün bu bileşimlerin antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar yapılan ara tır-

mamızı desteklemektedir.

Tanı vd. (2009) yaptıkları bir çalışmada *N.sativa* tohumlarından kloroform, metanol ve aseton ile hazırladıkları ekstraktların Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi belirlemişlerdir. Çalışmalarında aseton ile hazırlanan ekstraktın daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çörekotunun antibakteriyel etkisinin yanı sıra bağımlılık güçlendirdiği ve büyüme performansında artışa yol açtığı da bildirilmiştir (Awad vd., 2013; Altınterim, 2010).

Awad vd. (2013), yaptıkları bir çalışmada çörekotu yağının alabalıkların bağımlılık üzerindeki etkisini incelemişler ve olumlu sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada çörekotu yağının *V. anguillarum* ve *L. garvieae*'nin neden olduğu vibriosis ve laktokokkozisin tedavisinde kullanılabilir potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte gelecekte yapılacak olan çalışmalarda çörekotu yağının bu patojenlere karşı *in vivo* çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

Kaynaklar

- Ali, B.H. ve Blunden, G. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research*, 17(4), 299-305.
- Altınterim, B. 2010. Çörekotu (*Nigella sativa*, L) Yağının Gökkuşan Alabalığı (*oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1972)'nin İmmün Sistemine Etkisinin Araştırılması. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ.
- Akgul, A. 1989. Antimicrobial activity of black cumin (*Nigella sativa* L.) essential oil. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 6(1): 63-68.
- Arici, M., Sagdic, O. ve Gecgel, U. 2005. Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas y Aceites*, 56(4): 259-262.
- Awad, E., Austin, D. ve Lyndon, A.R. 2013. Effect of dietary supplement of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and Nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 388-391.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. ve Lindequist, U. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252: 79-84.
- Burits, M. ve Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5): 323-328.
- Cerit, L.S. ve Gökçe, R. 2008. Bazı Baharat Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri, T.C. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, Pamukkale.
- Cecchini, C., Cresci A., Coman, M.M, Ricciutelli, M., Sagratini, G., Vittori, S., Lucarini, D. ve Maggi, F. 2007. Antimicrobial activity of seven hypericum entities from central Italy". *Planta Med.*, 73 (6): 564-6.

- Farrag, H.A., El-Bazza, Z., El-Fouly, M. ve El-Tablawy S.Y.M. 2000. Effect of gamma radiation on the bacterial flora of *Nigella sativa* seeds and its oil constituents. *Acta Pharma*, 50: 195-207.
- Hanafy, M.S.M. ve Hatem, M.E. 1991. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacology*, 34: 275-278.
- Khan, M., Ashfaq, M.K., Zuberi H.S., Mahmood, M.S. ve Gilani, A.H. 2003. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytotherapy Research*, 17: 183-186.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993. Performance Standards Antimicrobial Disc Susceptibility Tests. Approved Standard Fifth Edition. NCCLS Document M2-A5, Villanova, PA, USA.
- Shittu, L., Bankole M.A., Ahmed, T., Bankole, M.N., Shittu, R.K., Saalu ve C.L., Ashiru O.A. 2007. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils of Crude Extracts of Sesame Radiatum against Some Common Pathogenic Micro-Organisms, *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics (IJPT)*, 6(2):165-170.
- Tanis, H., Aygan A., ve Digrak M., 2009., Antimicrobial activity of four nigella species grown in southern turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, 11(6): 771-774.