

## Bakteriyel Balık Patojenlerine Karşı Portakal (*Citrus sinensis*) Kabuğu Uçucu Yağının *In vitro* Antibakteriyel Etkisi

Esin BABA

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Muğla

Geliş : 06.02.2018

Kabul : 02.05.2018

**Araştırma Makalesi / Research Paper**

Sorumlu Yazar: esinbaba48@hotmail.com

E.Dergi ISSN: 1308 -7517

### Özet

Bu çalışmada portakal (*Citrus sinensis*) kabuğundan elde edilen uçucu yağın farklı konsantrasyonlarda (%1, %2,5, %5, %7,5 ve %10), bakteriyel balık patojenlerinden; *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garvieae*, *Listonella anguillarum*, *Vagococcus salmoninarum* ve *Vibrio alginolyticus*'a karşı *in vitro* antibakteriyel etkisi belirlenmiştir. Portakal kabuğundan uçucu yağ eldesi hidro distilasyon yöntemiyle, uçucu yağın kimyasal içeriği ise gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilmiştir. Uçucu yağda on beş farklı bileşen tespit edilmiş ve major bileşen D-limonene (%73) olarak belirlenmiştir. *In vitro* antibakteriyel aktivite disk difüzyon ve mikrodilüsyon metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın etkili olduğu patojenin *L. anguillarum* olduğu ve sırasıyla *Y. ruckeri*, *V. alginolyticus*, *V. salmoninarum*, *A. hydrophila* ve *L. garvieae*' nın takip ettiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında portakal kabuğundan elde edilen yağın antibakteriyel özelliğe sahip olduğu ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** bakteriyel balık patojenleri, portakal kabuğu, uçucu yağ, antibakteriyel aktivite

### *In vitro* Antibacterial Effect of Orange (*Citrus sinensis*) Peel Essential Oil Against Bacterial Fish Pathogens

#### Abstract

The aim of this study was to determine the effect of different concentrations of orange (*Citrus sinensis*) peel oil (1%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10%), a against bacterial fish pathogens; *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garvieae*, *Listonella anguillarum*, *Vagococcus salmoninarum* and *Vibrio alginolyticus*. The chemical composition of the essential oil obtained from the peels, was analyzed by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Fifteen components were identified in the steam essential oils and the main major component is D-limonene (73%). Essential oil derived from orange peel was applied against the bacteria using the disc diffusion and micro dilution method under *in vitro* conditions. As a result of this study, the orange peel essential oil significantly inhibited the growth of *L. anguillarum* by followed *Y. ruckeri*, *V. alginolyticus*, *V. salmoninarum*, *A. hydrophila* and *L. garvieae*. The study results showed that the oil obtained from the orange peel induced antibacterial properties and it should be supplemented with *in vivo* work.

**Keywords:** bacterial fish pathogen, orange peel, essential oil, antibacterial activity

## GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde görülen infeksiyöz hastalıklar ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Balıklar çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı oldukça duyarlıdır (Hatha vd., 2005). Su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin bilinçsiz bir şekilde kullanımı, dirençli bakterilerin gelişimine yol açabileceği gibi, çevre, insan ve diğer canlılar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (Hatha vd., 2005; Serrano, 2005).

Bu nedenle bakteriyel hastalıkları kontrol etmek için alternatif, doğal, çevreye herhangi bir olumsuz etkisi olmayan destekleyici ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkiler sahip oldukları içeriklerinden dolayı, alternatif çözüm önerilerinin en zengin kaynaklarından biri olabilirler (Cowan, 1999). Bitki uçucu yağ ve ekstraktının balık patojenlerine karşı etkili olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Bansemir vd., 2006; Al-Ani vd., 2009; Ekici vd., 2011; Mahmoodi vd., 2012). Dubey vd. (2011) disk difüzyon metoduyla yaptıkları çalışmada portakal kabuğu ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Shigella flexineri*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* patojenlerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer farklı bir çalışmada portakal kabuğu ekstraktının *Klebsiella pneumonia* patojenine karşı antibakteriyel etkisi tespit edilmiştir (Chabuck vd., 2014). Portakal, Rutaceae familyasına ait *Citrus sinensis* olarak bilinen bir bitkidir. *C. sinensis* dünyada en çok yetiştirilen meyvelerden bir tanesidir ve toplam üretiminin yaklaşık 120 milyon ton olduğu bilinmektedir. Portakal ağaçları, lezzetli meyve suyu ve tıbbi değerleri olması nedeniyle tropik ve subtropikal iklimlerde yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. Narenciye grubu bitkilerin uçucu yağları çoğunlukla atık olarak göz ardı edilen meyve kabuklarında bulunmaktadır. Portakal uçucu yağları, % 85-99 arası uçucu ve % 1-15 arası uçucu olmayan bileşenlerden oluşmaktadır. Uçucu bileşenler monoterpen (limonen), seskiterpen, hidrokarbonlar ve onların oksijenlenmiş türevlerinin bir karışımıdır (Smith vd., 2001). Portakalda bulunan bakteriyostatik etkiler bileşenin özellikle limonenin yüksek içeriğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca narenciye kabukları flavonoid, glikozitler, kumarinler,  $\beta$  ve  $\gamma$  sterooller bakımından zengindir (Sultana vd., 2007). Yapılan çalışmalar incelendiğinde narenciye grubu uçucu yağların antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Hussain vd., 2015; Öntaş vd., 2016). Bu çalışmada, portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi ve bakteriyel balık patojenlerinden; *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garvieae*, *Listonella anguillarum*, *Vagococcus salmoninarum* ve *Vibrio alginolyticus*' a karşı *in vitro* antibakteriyel etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Portakal Kabuğundan Uçucu Yağ Eldesi

Portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağ hidro distilasyon yöntemiyle cleveger cihazıyla çıkarılmıştır. Bu amaçla 150 g taze kuru kabuk, 1500 mL su ile sisteme ilave edilmiştir. Yağ kaynama sıcaklığında 3 saat distilasyon işleminden sonra elde edilmiştir. Elde edilen yağ cam şişelerde + 4 °C'de muhafaza edilmiştir (Hussain vd., 2008).

### GC MS Analizi

Uçucu yağ örneğinin kimyasal bileşeni Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında, Gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GS-MS) analizi Agilent GC (Model 6890) ve Agilent GC (Model 5973) dedektörleri (MSD) kullanılarak belirlenmiştir. Uçucu yağlardaki bileşenlerin tanımlanması Wiley 275 MS veri kütüphanesinden yararlanılarak tanımlanmıştır (Topçu vd., 2013).

### Bakteriyel Balık Patojenleri

Portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın *in vitro* antibakteriyel özelliğinin belirlenmesi için hasta balıklardan izole edilmiş *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garvieae*, *Listonella anguillarum*, *Vagococcus salmoninarum* ve *Vibrio*

*alginoliticus* suşları kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan patojen suşlar ve kökenleri Tablo 1’ de verilmiştir.

**Tablo 1.** Bakteri suşları ve orijinleri.

Bakteri	Orijin
<i>Yersinia ruckeri</i>	Gökkuşuğu alabalığı, Fethiye
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sazan, Çanakkale
<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşuğu alabalığı, Fethiye
<i>Listonella anguillarum</i>	Gökkuşuğu alabalığı, Fethiye
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	Gökkuşuğu alabalığı, Isparta
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Levrek, Bodrum

## Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

### Disk difüzyon testi

Portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle tespit edilmiştir (Andrew, 2004). Elde edilen uçucu yağ % 1, % 2,5, % 5, % 7,5 ve % 10 konsantrasyonlarda olacak şekilde metanolde çözülmüştür (Ekici vd., 2011). Gram negatif bakterilerden *Y. ruckeri*, *A. hydrophila*, *L. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve Gram pozitif bakterilerden *V. salmoninarum* ve *L. garvieae* kullanılmıştır. *L. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları için besiyerine %2 tuz ilavesi yapılmıştır. Önceden hazırlanan bakteri suşları Mc Farland 0,5 ( $10^8$  CFU/mL) standartlarına göre hazırlanarak Müller Hinton Agar üzerine 100 µL inokule edilip eşit bir şekilde bageet yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra her bir konsantrasyondan 25 µL olacak şekilde steril boş antibiyotik disklere absorbe edilmeleri sağlanarak besiyeri üzerine belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak disklerden bir tanesine sadece methanol eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak Oksitetrasiklin (OTC) 20 µg dozunda kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon üç paralel olacak şekilde çalışılmış ve değerlerin ortalaması alınmıştır. 25°C’ de 24 saat inkübasyon süresinin ardından tüm suşlar için inhibisyon bölgesi ölçümü yapılmıştır. Test edilen inhibisyon zonlarının çapları milimetre (mm) ölçme ölçeği ile değerlendirilmiştir.

### Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi

Portakal kabuğu uçucu yağının minimum inhibisyon konsantrasyonu Eloof (1998) tarafından tanımlanan metodun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Bakteri süspansiyonları Mc Farland 0,5’ e göre hazırlanmıştır. Uçucu yağın metanol içinde 1.000 µl/ml olacak şekilde çalışma stoğu oluşturulmuştur. Hazırlanan stoktan, metanol aynı konsantrasyonda olmak koşuluyla, sürekli yarıya düşürülerek (500, 250, 125, 62,6, 31,25,15,62, 7,8, 3,9, 1,95, 0,97, 0,48, 0,24, 0,12, 0,06 µl/ml) steril tüplerde her bir değer için bağımsız olarak çalışma stokları hazırlanmıştır. MİK değerinin okunması için 96 kuyucuklu düz mikro plakalara hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çalışma stoklarından 100 µL eklenmiştir. Üzerine 100 µL bakteri süspansiyonu eklenip ve toplam hacim kuyucuk başına 200 µl’ ye tamamlanmıştır. Çalışma iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Plakalar 24 saat boyunca 22-25°C’ de inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak eşit hacimde metanol ve müller hinton broth (MHB) karıştırılarak kullanılmıştır. Mikrobiyal büyüme 630 nm’ de multiscan spektrofotometrede ölçülmüştür. MİK değerleri bakteriyel büyümeyi tamamen inhibe eden yağların en düşük konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir.

## İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler standart hata (SEM) ile aritmetik ortalamalar olarak ifade edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey' in çiftli karşılaştırma testleri ile değerlendirilmiştir. Tablolardaki sayılar  $P < 0,05$  e göre istatistiksel farklılıklar göstermektedir.

## BULGULAR

### Portakal Kabuğundan Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Bileşenleri

Portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın analiz bulgularına göre 15 farklı bileşen tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre D-limonene (%73) major bileşen olarak saptanmıştır. Diğer önemli bileşenler %7 myrcene, %3,5 valencene, %3 alpha-Terpineol, %2,5  $\alpha$ - Pinene, %2 6-octen-1-ol, 3,7-Dimethyl (-R), %1,5 alpha-Terpinene ve %1 gamma-Terpinene olarak belirlenmiştir.

### In vitro Antibakteriyel Aktivite

#### Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın antibakteriyel aktivite sonuçları Tablo 2' de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum inhibisyon zonları %10' luk konsantrasyonda sırasıyla *L. anguillarum* (23,33±1,20), *Y. ruckeri* (21,33±0,33), *V. alginolyticus* (21,00±0,57), *V. salmoninarum* (20,33±0,88) ve *A. hydrophila* (20,00±0,57)' da tespit edilmiştir. Minimum inhibisyon zonu *L. garvieae*'de (15,00±0,57) olarak ölçülmüştür. Ayrıca negatif kontrol grubunda inhibisyon zonunun oluşmadığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan oksitetrasiklinde (OTC) inhibisyon zonları *Y. ruckeri* (24,66±0,88), *A. hydrophila* (20,66±0,87), *L. anguillarum* (10,33±0,85), *V. salmoninarum* (23,66±0,74), *L. anguillarum* (26,00±0,57) ve *V. alginolyticus* (21,66±1,45) olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 2.** Portakal kabuğu uçucu yağının farklı bakteriyel balık patojenlerine karşı antibakteriyel aktivitesi (inhibisyon zon çapı, mm)

Bakteri	Portakal kabuğu uçucu yağının farklı konsantrasyonları					Antibiyotik
	%1	%2,5	%5	%7,5	%10	OTC
<i>Y. ruckeri</i>	7,00±0,57 <sup>f</sup>	10,00±0,54 <sup>de</sup>	12,00±0,57 <sup>d</sup>	18,00±0,55 <sup>bc</sup>	21,33±0,33 <sup>b</sup>	24,66±0,88 <sup>ab</sup>
<i>A. hydrophila</i>	8,00±0,57 <sup>ef</sup>	8,66±0,33 <sup>ef</sup>	11,00±0,57 <sup>d</sup>	15,00±0,57 <sup>c</sup>	20,00±0,57 <sup>b</sup>	20,66±0,87 <sup>b</sup>
<i>L. garvieae</i>	6,00±0,57 <sup>f</sup>	6,00±0,56 <sup>f</sup>	7,00±0,57 <sup>f</sup>	12,00±0,57 <sup>d</sup>	15,00±0,57 <sup>c</sup>	10,33±0,85 <sup>de</sup>
<i>V. salmoninarum</i>	7,33±0,33 <sup>f</sup>	8,66±0,88 <sup>ef</sup>	12,00±0,57 <sup>d</sup>	15,33±0,88 <sup>c</sup>	20,33±0,88 <sup>b</sup>	23,66±0,74 <sup>ab</sup>
<i>L. anguillarum</i>	9,00±1,15 <sup>c</sup>	13,00±1,00 <sup>ed</sup>	18,33±0,88 <sup>bc</sup>	20,33±0,88 <sup>b</sup>	23,33±1,20 <sup>ab</sup>	26,00±0,57 <sup>a</sup>
<i>V. alginolyticus</i>	7,66±0,66 <sup>f</sup>	10,33±0,88 <sup>de</sup>	12,00±0,57 <sup>d</sup>	20,00±0,57 <sup>b</sup>	21,00±0,57 <sup>b</sup>	21,66±1,45 <sup>b</sup>

(M±SE; indicates Mean ± Standard error).

### Minimum İnhibisyon Sonuçları (MİK)

Portakal kabuğu uçucu yağının minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) sonucu Tablo 3' te verilmiştir. Sonuçlara göre en yüksek MİK değerinin *L. anguillarum* (31,25  $\mu$ L/mL)' da olduğu tespit edilirken, onu sırasıyla *Y. ruckeri* ve *V. salmoninarum* (62,5  $\mu$ L/mL), *A. hydrophila* ve *V. alginolyticus* (125  $\mu$ L/mL), *L. garvieae* (250  $\mu$ L/mL)' un takip ettiği tespit edilmiştir.

**Tablo 3.** Portakal kabuğu uçucu yağının farklı balık patojenlerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları

Portakal kabuğu uçucu yağı							
Miktar	Bakteri türü						
(µl/mL)	<i>Y. ruckeri</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>V. salmoninarum</i>	<i>L. anguillarum</i>	<i>V. alginolyticus</i>	
500	-	-	-	-	-	-	
250	-	-	-	-	-	-	
125	-	-	+	-	-	-	
62,5	-	+	+	-	-	+	
31,25	+	+	+	+	-	+	
15,62	+	+	+	+	+	+	
7,8	+	+	+	+	+	+	
3,9	+	+	+	+	+	+	
1,95	+	+	+	+	+	+	
0,975	+	+	+	+	+	+	
0,48	+	+	+	+	+	+	
0,24	+	+	+	+	+	+	
0,12	+	+	+	+	+	+	
0,06	+	+	+	+	+	+	
Metanol	+	+	+	+	+	+	

(+): üreme var, (-): üreme yok.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Doğadaki en önemli kural madde akış döngüsünün sağlanmasıdır. Organik bir atık olan portakal kabuğunun tekrar değerlendirilerek geri dönüştürülmesinin sağlanması hem ekonomik hem de doğal madde döngüsü için oldukça önemlidir. Uçucu yağlar sahip oldukları kimyasal bileşenlerden dolayı patojenik mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkiye sahiptirler. Çalışma sonuçlarına göre portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağ %73' lük oranla D-limonen, %7 myrcene, %3,5 valencene, %3 alpha-Terpineol, %2,5  $\alpha$ -Pinene, %2 6-octen-1-ol, 3,7-Dimethyl (-R), %1,5 alpha-Terpinene ve %1 gamma-Terpinene içerdiği tespit edilmiştir. Portakal kabuğunda bulunan limonen bileşeninin antibakteriyel ve antiseptik aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Magwa vd., 2006; Geraci vd., 2017). Turunçgillerden elde edilen yağlarda, fazla miktarda monoterpen hidrokarbon (%70-95) içermekte ve D-limonen, bildirilen tüm tatlı portakal yağlarında baskın olarak bulunmaktadır (Geraci vd., 2017). Portakal kabuğunda yapılan kimyasal içerik çalışmaları incelendiğinde çalışmamızla uyumlu olarak en önemli bileşenin limonen olduğu rapor edilmiştir (Dugo ve Mondella, 2011; Debbarma vd., 2013; Geraci vd., 2017). Yapılan başka bir çalışma incelendiğinde, portakal uçucu yağının başlıca ana bileşen olarak % 77.37 oranında limonen içerdiği belirlenmiştir (Djenane, 2015).

Çalışma verilerine göre portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın mikroorganizmalar üzerinde etkisi incelendiğinde sırasıyla *L. anguillarum*, *Y. ruckeri*, *V. alginolyticus*, *V. salmoninarum*, *A. hydrophila* ve *L. garvieae*'de olduğu belirlenmiştir. Elde edilen uçucu yağın en güçlü antibakteriyel aktiviteyi gösterdiği patojenin % 10'luk konsantrasyonda *L. anguillarum* olduğu belirlenmiştir. Mikrodilüsyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek MİK değerinin *L. anguillarum* (31,25 µL/mL)' da olduğu tespit edilirken, onu sırasıyla *Y. ruckeri* ve *V. salmoninarum* (62,5 µL/mL), *A. hydrophila* ve *V. alginolyticus* (125 µL/mL), *L. garvieae* (250 µL/mL)'un takip ettiği tespit edilmiştir. Portakal yağının en etkili olduğu bakteri olan *L. anguillarum*'a 31,25 µl/ml dozda etkili olduğu tespit belirlenmiştir. Öntaş vd. (2016) limon kabuğundan (*C. limon*)

elde edilen uçucu yağın *Y. ruckeri*, *A. hydrophila*, *L. anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii* ve *L. garvieae* patojenlerine karşı yaptıkları antibakteriyel aktivite çalışmasında elde edilen uçucu yağın bu patojenler üzerinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Özellikle *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* için belirlenen antibakteriyel aktivite bizim çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermiştir. Obidi vd. (2013) portakal yağının antimikrobiyal etkisini *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* patojenleri üzerinde denemişlerdir. Portakal yağının bütün organizmalar üzerinde engelleyici etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Gıda patojenleri üzerine yapılan başka bir çalışma incelendiğinde portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın *Bacillus subtilis* üzerinde en güçlü etkiyi gösterdiği, onu sırasıyla *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* ve *Vibrio vulnificus* 'un takip ettiği belirlenmiştir. (Debbarma vd., 2013).

Yapılan çalışma sonuçları değerlendirildiğinde portakal kabuğundan elde edilen uçucu yağın çeşitli patojenler üzerinde güçlü bir antimikrobiyel etkiye sahip olduğu, bu etkinin özellikle major bileşen olan limonen bileşiğinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak portakal uçucu yağı bazı balık patojenlerine karşı potansiyel olarak antibakteriyel özellik göstermektedir. Ayrıca elde edilen uçucu yağ bir atık olan meyve kabuklarından elde edildiği için diğer bitkilerden daha ucuza temin edilebilecektir. Böylelikle hem daha ekonomik olabilecek hem de doğal geri dönüşüm sağlanabilecektir. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarla portakal kabuğu uçucu yağının *in vivo* çalışmalarla desteklenerek pratikte de uygulanabilmesi çalışma verileri açısından önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Al-Ani, WN., Al-Haliem, S.M. & Tawfik, N.O. (2009). Evaluation of the antibacterial activity of citrus juices: An in vitro study. *Al-Rafidain Dental Journal*, 10, 376–382.
- Andrews, J.M. (2004). BSAC standardized disc susceptibility testing method (V.3). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53,713–728.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. & Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252, 79–84.
- Chabuck, S.I.A. & Chabuck, N.A.G. (2014). In vitro and in vivo effect of three aqueous plant extract on pathogenicity of *Klebsiella pneumonia* isolated from patient with urinary tract infection. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(6), 160–179.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12(4), 564–582.
- Debbarma, J., Kishore, P., Nayak, B.B., Kannuchamy, N. & Gudipati, V. (2013). Antibacterial activity of ginger, eucalyptus and sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 1022–1030.
- Djenare, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4, 208–228.
- Dubey, D., Balamurugan, K., Agrawal, R.C., Verma, R. & Jain, R. (2011). Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of methanolic and hydromethanolic extract of sweet orange peels. *Recent Research in Science and Technology*, 3(11), 22–25.
- Dugo, G. & Mondello L. (2011). Citrus oils, composition, advanced, analytical techniques, contaminants and biological activity. Boca Raton (FL): CRC Press Taylor and Francis Group, pp: 75–78.

- 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*, 17,47– 54.
- Elof, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64, 711–713.
- Geraci, A., Di Stefano, V., Di Martino, E., Schillaci, D. & Schicchi, R. (2017). Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 31(6), 653–659.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J. & Christol. (2005). Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 131–134.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H. & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986–995.
- Hussain, K.A., Tarakji, B., Kandy, B.P.P., John, J., Mathews, J., Ramphul, V. & Divakar, D.D. (2015). Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against periodontopathic bacteria: An in vitro study. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 66(2), 173–178.
- Magwa, M.L., Gundidza, M. & Gweru, N., (2006). Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of sesuvium portulacastrum. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 85–89.
- Mahmoodi, A., Roomiani, L. & Soltani M., (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. *Global Veterinaria*, 9, 73–79.
- Obidi, O.F., Ayoola, G.A., Johnson, O. O., Hassan M. O. & Nwachukwu S.C.U. (2013). Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *International Journal of Biochemistry*, 2(6),113–122.
- 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 Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(5), 741–749.
- Serrano, P.H. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. In, Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Technical Paper, Roma, pp: 469.
- Smith, D.C., Forland, S., Bachanos, E., Matejka, M. & Barrett, V. (2001). Qualitative analysis of citrus fruits extracts by GC/MS: an undergraduate experiment. *Journal of Chemical Education*, 6, 28–31.
- Sultana, S.M., Ali, S., Ansari, H. & Bagri, P. (2007). A new sesquiterpene derivative from fruit peel of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. *Scientia Pharmaceutica*, 75, 165–170.