

**T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BİTKİ EKSTRAKTLARININ GIDA KAYNAKLI PATOJEN  
MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mustafa ASLAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ**

**Mayıs 2019**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİ EKSTRAKTLARININ GIDA KAYNAKLI PATOJEN  
MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa ASLAN

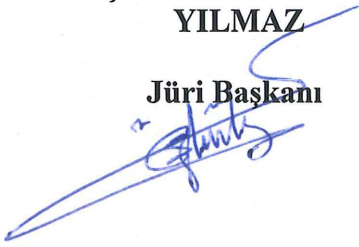
Enstitü Anabilim Dalı

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 10/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

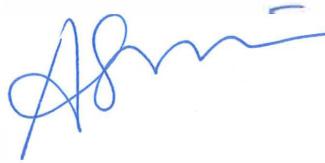
Doç. Dr. Suzan ÖZTÜRK  
YILMAZ

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Arzu ÇAĞRI  
MEHMETOĞLU

Jüri Üyesi



Dr. Öğr. Üyesi  
Mutlu ÇELİK

Jüri Üyesi



## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Mustafa ASLAN

10/05/2019

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Prof. Dr. Zehra AYHAN'a ve çalışmalarım esnasında yardım eden Arş. Gör. Eda KILIÇ'a teşekkür ederim.

Son olarak çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Müzeyyen ASLAN, babam Durdu ASLAN ve ablam Ayça ASLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	ix
ÖZET .....	x
SUMMARY .....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Gıda Maddelerinde Doğal Antimikrobiyal Sistemler .....	4
2.1.1. Hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyaller .....	5
2.1.2. Bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyaller.....	6
2.1.2.1. Çalışmada kullanılan baharatlar .....	7
2.1.3. Mikroorganizma kaynaklı antimikrobiyaller .....	9
2.1.3.1. Nisin .....	10
2.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Etki Eden Faktörler.....	10
2.3. Fenolik Maddeler ve Antimikrobiyal Etki Mekanizması .....	12
2.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler....	14
2.4.1. Disk difüzyon yöntemi.....	14
2.4.2. Tirbüdimetrik yöntem .....	14
2.4.3. İmpedimetrik yöntem.....	15

2.4.4. Geleneksel mikrobiyolojik yöntem.....	15
2.4.5. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) .....	15
2.5. Mikroorganizmalar.....	16
2.5.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.5.3. <i>Bacillus cereus</i> .....	19
2.5.4. <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	20
2.5.5. <i>Cronobacter sakazakii</i> .....	21
2.6. Çalışmada Kullanılan Standart Antibiyotik Diskler .....	22
2.6.1. Tetracycline(Te30).....	22
2.6.2. Cephalexin(CI 30).....	22
2.7. Biberiye ve Sarımsak ile İlgili Önceki Çalışmalar.....	23

### BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Materyaller .....	28
3.1.1. Baharat örnekleri.....	28
3.1.2. Ekstraksiyon materyal ve solusyonları .....	28
3.1.3. Bakteri kültürleri ve kültür ortamları .....	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Biberiye ekstraktının elde edilmesi.....	29
3.2.2. Sarımsak ekstraktının elde edilmesi.....	29
3.2.3. Bakteriyal yoğunluğun ayarlanması .....	30
3.2.4. Nisin çözeltisinin hazırlanışı.....	30
3.2.5. Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metotlar.....	30
3.2.5.1. Disk difüzyon yöntemi .....	30
3.2.5.2. Mikrodilüsyon yöntemi .....	31
3.2.5.3. Tween 20 varlığında ortamın yağ içeriğinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi ..	32
3.2.5.4. Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi .....	33

3.2.5.5. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara bazı antibiyotiklerin etkisi ile biberiye ve sarımsak ekstraktlarının aktivitesinin karşılaştırması.....	33
3.2.5.6. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara nisin'in antimikrobiyal etkisi.....	34
3.2.5.7. İstatistiksel deneme modeli .....	34

## BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	35
4.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Elde Edilen Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	35
4.1.1. Sarımsak ekstraktının inhibisyon zonları.....	35
4.1.2. Biberiye ekstraktının inhibisyon zonları .....	37
4.1.3. Bazı standart antibiyotiklerin çalışma bakterilerine antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi .....	39
4.2. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları .....	40
4.2.1. Biberiye ekstraktının MİK değerleri .....	40
4.2.2. Sarımsak ekstraktının MİK değerleri .....	41
4.2.3. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara nisin'in antimikrobiyal etkisi .....	42
4.2.4. Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) .....	42
4.3. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin Sarımsak Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi .....	44
4.3.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	44
4.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
4.3.3. <i>Bacillus cereus</i> .....	45
4.3.4. <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	45
4.3.5. <i>Cronobacter sakazakii</i> .....	46
4.4. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin Biberiye Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	46

4.4.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	47
4.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
4.4.3. <i>Bacillus cereus</i> .....	47
4.4.4. <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	48
4.4.5. <i>Cronobacter sakazakii</i> .....	48
4.5. Tween 20'nin Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi .....	49
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR .....	55
ÖZGEÇMİŞ .....	65



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Cl 30	: Cephalexin 30
CM	Santimetre
°C	: Santigrad derece
DMSO	: Di Metil Sülfoksit
Gr (-)	: Gram negatif
Gr (+)	: Gram pozitif
GRAS	: Genellikle güvenilir kabul edilir
Kob/ml	: Mililitrede bulunan koloni bakteri sayısı
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MM	: Milimetre
MG	Miligram
PPM	: Milyonda bir
Te 30	: Tetracycline 30
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
Tween 20	: Polyoxiethylene (2) sorbitan monolaurate
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
%	Yüzde

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Sarımsak ekstraktının <i>B. cereus</i> üzerindeki etkisi .....	36
Şekil 4.2. Cephalexin30 (Cl30) ve Tetracycline30(Te30)'nin <i>H. pylori</i> üzerindeki etkisi .....	40

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı Baharatların/Bitkilerin Etki Alanı ve Aktif Bileşenleri (Meyer ve diğ., 2002). .....	8
Tablo 4.1. Sarımsak Ekstraktının Oluşturduğu Ortalama İnhibisyon Zonları (mm) .	35
Tablo 4.2. Biberiye Ekstraktının Oluşturduğu Ortalama İnhibisyon Zonları (mm)....	37
Tablo 4.3. Standart Antibiyotik Disklerin Oluşturdukları Ortalama İnhibisyon Zonları (mm).....	39
Tablo 4.4. Biberiye Ekstraktının 96 kuyucuklu Mikrodilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları .....	40
Tablo 4.5. Sarımsak ekstraktının 96 kuyucuklu Mikrodilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları .....	41
Tablo 4.6. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalara Karşı Nisin'in Antimikrobiyal Etkisi.....	42
Tablo 4.7. Mikrodilüsyon Yönteminde Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları.....	43
Tablo 4.18. Emülgatör Olarak Tween 20'nin Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Sarımsak Ekstraktlı Besiyerinde <i>S. aureus</i> Gelişimi (kob/ml).....	50
Tablo 4.19. Emülgatör Olarak Tween 20'nin Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Biberiye Ekstraktlı Besiyerinde <i>S. Typhimurium</i> Gelişimi (kob/ml) .....	50

## **GRAFİKLER LİSTESİ**

Grafik 4.1. Sarımsak ekstraktının patojenler üzerindeki etkileri .....	36
Grafik 4.2. Biberiye ekstraktının patojenler üzerindeki etkileri .....	38

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biberiye, Sarımsak, Gıda Patojenleri, Antimikrobiyal etki

Bu çalışmada sarımsak ve biberiye; gıda kaynaklı *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium patojen bakterileri üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla kağıt disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan analizler her bir örnek için 3 defa tekrar edilmiş ve ortalaması alınmıştır. Biberiye ve sarımsak ekstraktının her ikisinin de belirtilen gıda kaynaklı beş patojen üzerine farklı oranlarda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. En büyük zon, 30.1mm zon çapıyla *S. aureus* üzerinde 1/1 oranındaki sarımsak ekstraktında görülürken bunu; *B. cereus*>*C. sakazakii*>*S. Typhimurium*>*H. pylori* izlemiştir. Bu etki 1/8 oranında ise sadece *C. sakazakii* üzerinde görülmüştür. 1000 ppm biberiye ekstraktına en hassas bakteri *B.cereus* olurken, bunu *H. pylori* ve *S. aureus* takip etmiştir. Biberiye ekstraktına en dirençli bakteriler ise *S. Typhimurium* ve *C. sakazakii* olmuştur. Sarımsak ve biberiye ekstraktının antimikrobiyal etkileri, kullanımı yaygın olan antibiyotiklerden Cephalexin 30 (Ce30) ve Tetracycline 30 (Cl30) ile de kıyaslanmıştır. Sonuç olarak 1/1 oranındaki sarımsak ekstraktı; *H. pylori* hariç, mevcut tüm bakterilere Cl 30'dan daha yüksek antibakteriyel etki göstermiştir. Te 30 ise sadece *S. aureus*'a ve *B. ceresus*'a sarımsaktan daha az etki etmiştir.

Araştırmada, sarımsak ve biberiye ekstraktının mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri her bir patojen için farklılık göstermekle birlikte; biberiye ekstraktının MİK değeri, *H. pylori* ve *B. cereus* için 62.5 ppm olurken; *S. Typhimurium* için 250 ppm, diğer bakteriler içinse 125 ppm olmuştur. Sarımsak ekstraktının MİK değerleri ise; *H. pylori* için 1/16, *B. ceresus* ve *S. Typhimurium* için 1/8, *S. aureus* ve *C. sakazakii* için ise 1/4, seyreltme oranında elde edilmiştir.

Çalışmada, emülsiyon oluşumu için kullanılan Tween 20'nin ve ortamın yağ içeriğinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini de belirlemek üzere, sıvı kültür ortamına ayçiçek yağı ve Tween 20 ilave edilerek, mikrobiyal gelişim izlenmiştir. %20 yağ ve Tween 20'nin % 1.5 oranı; sarımsak ve biberiye ekstraktına karşı dirençli bakterilerden olan *S. aureus* ve *S. Typhimurium* üzerinde, istatistiksel olarak (p<0,05) önemli düzeyde etki göstermiştir.

# INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS ON FOODBORNE PATHOGENS

## SUMMARY

Keywords: Rosemary, Garlic, Foodborne Pathogens, Antimicrobial Effect

In this study garlic and rosemary was studied and inhibitory effects of these spice extracts on foodborne pathogens such as *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella Typhimurium* were investigated.

For this purpose, disc diffusion and microdilution methods were used. Analyses for each sample repeated three times and averaged. It was determined that rosemary and garlic extracts had antimicrobial effects for five foodborne pathogens studied, in different ratios. The largest zone was observed garlic extract with 1/1 ratio on *S. aureus* with a zone diameter of 30.1 mm; followed by *B. cereus*, *C. sakazakii*, and *S. Typhimurium*, *H. Pylori* respectively. This effect was seen in the 1/8 ratio only for *C. sakazakii*. The most sensitive bacteria to the 1000 ppm rosemary extract was *B. cereus* followed by *H. pylori* and *S. aureus*. The most resistant bacteria to the rosemary extract was *S. Typhimurium* and *C. sakazakii*. Antimicrobial effects of garlic and rosemary were compared with commonly used antibiotics such as Cephalexin 30 (Ce30) and Tetracycline 30 (Cl30). As a result, 1/1 ratio of garlic extract showed higher antibacterial effect than CI 30 on all of the existing bacteria with the exception of *H. pylori*. Te 30 had less effect only on *S. aureus* and *B. ceresus* than garlic.

In the study, the minimum inhibition concentration (MIC) values of garlic and rosemary extracts, determined by microdilution method, showed differences for each pathogen. The MIC value of the rosemary extract was 62.5 ppm for *H. pylori* and *B. cereus*; 250 ppm for *S. Typhimurium* and 125 ppm for other bacteria. MIC values of garlic extract are; 1/16 for *H. pylori*, 1/4 for *S. aureus* and *C. sakazakii*, and 1/8 for *B. ceresus* and *S. Typhimurium*.

In order to determine the effect of the oil content on antimicrobial activity, sunflower oil was added to the liquid culture medium and microbial growth was observed. The effect of Tween 20 used for emulsion formation on antimicrobial activity was also investigated. It was observed oil and tween 20 had antimicrobial effects on *S. aureus* and *S. Typhimurium*, at different ratios. It was determined that %20 oil and %1.5 Tween 20 concentration showed a significant effect on *S. aureus* and *S. Typhimurium* which are the most resistant to garlic and rosemary extract statistically showed inhibitor effect.

## **BÖLÜM 1. GİRİŞ**

Bitkiler senelerdir insan sağlığı ve yaşam kalitesini artırmak için kullanılmaktadır. Türkiye sahip olduğu bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Ülkemizde çok sayıda kültür bitkisinin yetişmesine uygun iklim koşulu ve toprak yapısı bulunmaktadır. Ülkemizde yaklaşık 174 familyaya ait 1251 cins ve 12000 tür ve alttür bitki, kayıtlarda olmakla birlikte bundan daha geniş bir bitki örtüsü dağılımı göstermektedir. Yaklaşık 500 kadarı tıbbi olarak kullanılabilen bu bitkilerin 200 tanesi hem tıbbi hem de aromatik amaçlı kullanılmakta ve ihraç edilmektedir (Erik ve Tarıkahya, 2004).

Gıda endüstrisinde gıdaların raf ömrünü uzatmak dayanıklılığını arttırmak için ısı işleme kurutma fermentasyon gibi çeşitli proseslerin yanı sıra kimyasal katkı maddelerinin kullanımı söz konusudur. Birçok gıda maddesi bir veya birden çok mikroorganizma gurubunu içerirler. Bunların bazıları gıdalarda istenilen rolü oynarken (doğal fermente gıdaların üretimi) diğerleri gıdalarda bozulmaya ve gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

Bu mikroorganizmalar gıda endüstrisinde insan sağlığına olumsuz etkide buldukları gibi gıdalarda bozulma ve kokuşmaya neden olduklarından dolayı üretici ve tüketici için büyük sorunlar teşkil etmektedir. Gıda güvenliği, gıda endüstrisinin son yıllarda en çok ilgilendiği ve en çok kaygılandığı konudur. Gıdalara üretim aşamasında değişik koruyucu maddeler ilave edilmektedir. Gıdaların korunmasında pek çok uygulama bulunmasına karşın biyolojik yolla gıdaların korunması günümüzde üzerinde en fazla odaklanılan uygulamalardan birisidir. Biyolojik koruma; pek çok uygulamanın aksine farklı kökenlerden gelen doğal antimikrobiyaller ile yapılmakta ve bu maddelerin sayısı arttıkça kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve gelişmektedir. Bu amaçla kullanılan ve üzerinde çalışmalar yapılan maddeler; hayvansal kaynaklı (lizozim,

laktoferrin ve magaininler), bitkisel kaynaklı ürünler (fitoaleksinler, otlar, baharatlar) ve mikrobiyal metabolitler (bakteriosinler, hidrojen peroksit, ve organik asitler) olarak gruplandırılabilir (Erkmen, 2010).

Fenolik maddeler gıdalarda antioksidan olmalarının yanı sıra mikrobiyal güvenlik açısından da önemlidir (Yalçın ve ark.,1997). Fenolik maddeler, gıda sanayi yanında farmakolojide de kullanılmaktadır. İlaç sanayinde fenolik maddelerin özellikle antimikrobiyal özelliklerinden faydalanılmaktadır (Nazck ve ark.,1995).

Gıdalarda bulunan bazı organik asitler de ortamın ya da hücre içinin pH'sını düşürerek veya hücre membranının geçirgenliğini değiştirip substrat taşınımını bozarak ya da mikroorganizmaların yaşamı için gerekli bazı metallerle şelat oluşturarak antimikrobiyal etki göstermektedirler. Sitrik asit, süksinik asit, malik asit ve tartarik asit bu grupta yer almaktadır Bitkisel ve hayvansal yağ asitlerinden 12-18 karbon atomu içeren orta zincirli yağ asitlerinin koruyucu madde olarak etkin oldukları bildirilmektedir (Ova, 2001).

Baharatlarda bulunan eugenol, timol, humulon, lupulon, allil izotiyosiyanat gibi bileşiklerin antimikrobiyal etkiye sahip olması; baharatların çoğunu Gr(+) bakteriler ve küflere karşı etkili hale getirmektedir. Yapılan araştırmalarda karışım halinde kullanılmalarının bu etkiyi daha da artırdığı görülmüştür (Yalçın ve ark., 1997).

Biberiyenin sekonder metabolitlerinin etkilerinin ölçümü üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda; antimikrobiyal, insektisit, antioksidan (Hussain ve ark. 2010) ve antikanser (Bai ve ark., 2010), etkileri olduğu belirtilmiştir.

Biberiye üzerine yapılan birçok çalışmada bileşenleri ve uçucu yağ miktarlarının çok büyük farklılıklar gösterdiği görülmektedir (Gülbaba ve ark., 2002). Bileşenlerinin ve uçucu yağ miktarının göstermiş olduğu bu farklılıklar; depo süresi, agronomik koşullar, bitkinin bulunduğu gelişim dönemi ve bitkinin yaşı ile hasat edilen organ gibi birçok faktörden etkilendiği bilinmektedir (Gurbuz ve ark., 2016).



Eski Mısır, Yunanistan, Roma ve Hindistan'da sarımsağın bir gıda, baharat ve ilaç olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Modern bilimin ilk çalışmalarını yapmış olan Pastör ve Lehmann sarımsağın antibakteriyel etkilerini daha o yıllarda ispatlamışlardır (Hughes ve Lawson 1991, Elsom ve ark.2000). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre 1900 bitkisel drog uluslararası farmokopilerde kayıtlı olup bunlar arasında en sık göze çarpanın sarmısak ve soğan olduğu bildirilmektedir (Topal, 1989).

Baharatların antimikrobiyal aktiviteleri; geniş oranda çeşitlilik göstermekte olup, baharat ve bitkinin türüne, test besiyerine ve mikroorganizmaların türüne bağlıdır (Toroğlu ve Cemet, 2006).

Bu nedenle; ne kadar çok farklı orijinli mikroorganizma suşlarıyla ve bitkilerle çalışılırsa o kadar güvenilir ve detaylı bilgi elde edilmesi mümkündür. Bu amaçla bu çalışmada sarımsak ve biberiye bitkisinin, *Helicobacter pylori*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Cronobacter sakazakii* üzerindeki antimikrobiyal etkileri hem katı hem sıvı besiyerinde araştırılmıştır. Çalışmada disk difüzyon ve 96 kuyucuklu mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca ortamın yağ içeriğinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla Tween 20 varlığında ortama yağ ilave edilerek antimikrobiyal gelişim izlenmiştir. Çalışma sonunda Tween 20 nin inhibitör etkiyi azaltıp azaltmadığı da belirlenmiştir. Bu çalışmada, son yıllarda sentetik koruyucuların zararlarının anlaşılması üzerine; doğal koruyuculara olan ilginin artmasıyla geleneksel olarak tedavi amaçlı ve tat verici olarak kullanılan, biberiye ve sarımsağın antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ**

### **2.1. Gıda Maddelerinde Doğal Antimikrobiyal Sistemler**

Gelişen teknoloji ile birlikte gıda endüstrisinde de gıdaları daha uzun süre tüketilebilir halde tutabilme isteği gıdaların üretiminde çeşitli antimikrobiyallerin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Antmikrobiyal maddeler gıdalarda istenmeyen ancak farklı yollarla gıdalara bulaşabilen bakteri, küf ve mayaları mikroorganizmaları ortamdan yok etmek, çoğalma ve faaliyetlerini önleyerek raf ömrünü uzatmak amacı ile gıdalara eklenmektedir. Bu amaçla kullanılan ilk antimikrobiyaller tuz, tütsü ve çeşitli baharatlar olmuştur. Başlangıçta bunlar daha çok lezzet verici olarak kullanılsa da daha sonraları gıdaların uzun süreleri dayandırılmalarında etkili oldukları anlaşılmıştır. Antimikrobiyaller iki kısımda incelenebilmektedir. Bunları laboratuvar koşullarında elde edilen yapay antimikrobiyaller ve biyolojik sistemlerde bulunan doğal antimikrobiyaller olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Birinci grupta yasal düzenlemelerle gıdalarda kullanımına izin verilen asetik asit ve asetat, benzoik asit ve benzoat, laktik asit ve laktat, nitrit ve nitrat, sorbik asit ve sorbat, sülfid gibi sentetik antimikrobiyaller yer alırken ikinci grupta ise hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli doğal antimikrobiyaller gelmektedir (Davidson ve Naidu, 2000).

Bu antimikrobiyallerin etkili olabilmesi için ortamın pH'sı, bileşimi, su aktivitesi ve kullanım miktarı etkin bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların gıdalar üzerinde oluşturdukları olumsuz etkileri ve toksik açıdan sebep oldukları zararları önlemek için hangi gıda katkı maddesinin kullanılması gerektiğinin belirlenmesi kadar önemli olan birtakım özellikler vardır. Bunlar; bu maddelerin belirli bir saflıkta olması basit yapıda olması ve geniş bir spekturumda etkili olması ve ucuz olmasıdır (Ayhan, 2000).

Bunların dışında bu maddelerin tüketiminden doğabilecek zararların düşük düzeyde olması toksik etki göstermemesi ve yağ dokularında birikmemesi gerekmektedir. Antimikrobiyallerin etkisi patojenlerin sayısının artmasını engelleyici veya patojenleri öldürücü olabilir. Gıdaların bileşimindeki birçok madde mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir (Ayhan, 2000).

Gıdaların bileşiminde yer alan bazı organik asitler de ortamın ya da hücre içinin pH'sını düşürerek, hücre membranının geçirgenliğinde farklılıklar oluşturup substrat taşınımını bozarak veya mikroorganizmaların yaşamı için gerekli bazı metallerle şelat oluşturarak antimikrobiyal etki göstermektedir. Sitrik asit, siksünik asit, malik asit ve tartarik asit bu gurubun içinde bulunmaktadır. Bitkisel ve hayvansal yağ asitlerinden 12-18 karbon atomu içeren orta zincirli yağ asitlerinin koruyucu madde olarak etken olduğu bildirilmektedir (Ova, 2001).

Doğal antimikrobiyal maddelerin bir kısmı gıdaların raf ömrünü arttırmakta kullanılmakta iken bir kısmı hala araştırma aşamasındadır. Yumurtada bulunan lizozim sütte bulunan laktoferrin ve laktoperoksidaz kan serumunda bulunan transferinler hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyalere örnek verilebilir. Baharat ve bitkilerden elde edilen carvacrol, eugenol, thymol, allicin gibi bileşenler ile esansiyel yağlar bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyalere örnek olurken mikroorganizmalardan elde edilen nisin ve pediosin gibi maddeler ise hayvansal kökenli doğal antimikrobiyaller arasındadır (Yılmaz ve Tosun, 2012).

Gıdaların bileşiminde bulunan birçok madde antimikrobiyaller; bitkisel kaynaklı, hayvansal kaynaklı ve mikrobiyal kaynaklı antimikrobiyaller olarak sınıflandırılabilirler (Davidson ve Naidu, 2003).

### **2.1.1. Hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyaller**

Gelişen gıda teknolojisi ile birlikte hayvansal kaynaklı farklı antimikrobiyaller de kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin sütte bulunan laktoferrin ve laktoperoksidaz sütün profilaktik ve terapötik özellikleri ile bioaktif komponentleri olarak bilinmektedirler.

Ayrıca yumurta akında bulunan birtakım antimikrobiyaller mikroorganizmaların çoğalmasını önleyici özelliğe sahiptirler. Yumurtadaki ovotransferin demir gibi metalleri; avidin ve ovoflavoprotein ise biotin ve riboflavin gibi vitaminleri bağlayıcı özelliğe sahiptir. Yumurta akından kristalizasyonla %70-80 oranında elde edilen ve 30°C'de yaklaşık 6 ay aktivitesini kaybetmeyen lizozim; bakteri hücre duvarındaki peptidoglukan tabakayı hidrolize eder. Özellikle Gr(+) bakterilere karşı etkili olmakla birlikte termofilik spor oluşturan bakterilere karşı da etkili olabilmektedir. Böylece süt ve süt ürünlerinde kullanılan nitrat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi kimyasalların yerine alternatif oluşturabilmektedir (Gill ve Holley, 2000).

### **2.1.2. Bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyaller**

Fenolik bileşenler ve bunların oksijen bağlı türevleri başta olmak üzere bitkiler sayısız aromatik bileşikler üretebilmektedir. Şu ana kadar yaklaşık 12.000 tanesi izole edilerek tanımlanmış olan bu maddeler ikincil metabolitler olarak üretilmekte olup aromatik bileşiklerin %10 unu oluşturmaktadırlar. Terpen, kinon ve tanin gibi maddeler antimikrobiyal araştırmalarda kullanıldığı gibi koku ve pigment oluşumunda rol oynamaktadırlar (Cowan, 1999). Bitkisel antimikrobiyal maddeler fenolikler, terpenoidler- uçucu yağlar, alkaloidler, lektinler- polipeptitler ve poliasetilenler olmak üzere beş grupta incelenmektedir. Fenoller bitkisel antimikrobiyal ajanların en geniş grubunu oluşturmaktadırlar (Erdoğan ve ark., 2013).

Antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olan bitkiler ve baharatlar gıda sektöründe güzel koku ve lezzet verici olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bitki ve baharatlardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin bakteri ve küfler üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Ticari anlamda en yaygın kullanılan baharat ve bitkiler; sarımsak, kekik, biberiye, kırmızıbiber, karanfil, karabiberdir. Bunların yanında nane, maydanoz, adaçayı, defne gibi bitkilerin de mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

### 2.1.2.1. Çalışmada kullanılan baharatlar

#### 2.1.2.1.1. Biberiye (*Rosmarinus Officinalis F.*)

Laminaceae familyasına ait ve botanik adı *Rosmarinus Officinalis F.*'olan biberiye son derece önemli tıbbi ve aromatik bir bitki türüdür. Çok yıllık, kışın yaprak dökmeyen ve soluk mavi renkli çiçeği olan bu bitki, çalı görünümündedir. Adana ve Mersin illerinde yaygın olarak bulunmakla birlikte Türkiye'nin güney ve batı kıyılarında doğal olarak yetişmektedir.

Esas etken maddesi uçucu yağlar olan biberiyeden %1-2 arasında uçucu yağ elde edilmektedir. Sineol, kafur ve borneol uçucu yağları oluşturan en önemli bileşenlerdendir. Biberiye yapraklarının antimikrobiyal aktiviteye sahip biyoaktif bileşenlerden; carnosic asit, carnosol, rosmanol, ve onun izomerleri epiisorosmanol ve epirosmanol, flavonoidlerden homoplantoginin cirsimaritin genkwanin, galocatechin, nepetrin, hesperidin, 6-hydroxyluteloil-7-glucoside, luteloil-3'-glucuronide ve luteloil-3'-0-/0-acety)- $\beta$ -D glucuronidenin iki izomerini içerdiği belirtilmiştir.

Biberiye bitkisinin bazı hastalıklara iyi geldiği bilinmektedir. Bunlar; halsizlik, astım, selülit, kolesterol, karaciğer, migren, ödem, unutkanlık olmakla birlikte biberiyenin antiseptik, idrar artırıcı, güç verici, yara iyileştirici gibi özellikleri de vardır (Acartürk,1993). Biberiye bitkisinde bulunan aromanın konsantrasyonunun yüksek olmasından dolayı 1000 ppm'in üzerinde bir miktarda kullanılması tat ve kokuda olumsuz etkilere sebep olmaktadır. (Şengün ve ark., 2000).

Biberiyenin ekstrakte edilmeden katılımlarının et ve et ürünlerinde birtakım duyuşsal sorunlara neden olduğu bazı araştırmacılarca belirtilmiştir (Liu ve ark., 1992; Turp, 1999).

Biberiyeden elde edilen uçucu yağ ve metanol ekstratlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, metanol ekstresinin uçucu yağa göre daha az antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Çelikleş ve ark., 2007). Biberiyenin

bileşenleri, oranları ve etkileri üzerine yapılan bir çalışmada sonuçların mevsime, bölgelere, bitkinin kullanılan kısmına, elde ediliş yöntemi ve ekstraksiyonda kullanılan solvente ayrıca bitkinin genetik, su, ışık ve vejetasyon dönemine göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir (Del Baño ve ark., 2003).

Biberiye günümüzde kozmetik, parfümeri, aromaterapi, eczacılık ve gıda gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Gıda üretiminde en yaygın bir şekilde kullanılan ve en etkili baharat bitkisi biberiyedir. Avrupa ve Amerika’da antioksidan olarak, ticari amaçlı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bozin ve ark., 2007). Yapılan bilimsel çalışmalarla biberiye’nin antibakteriyel, antioksidan, antiviral bağışıklık sistemini iyileştirici etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (Gachkar ve ark., 2007).

#### 2.1.2.1.2. Sarımsak (*Allium Sativum*)

Alliaceae familyasına ait ve botanik adı *Allium Sativum* olan sarımsak insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olup baharat şeklinde yaygın bir tüketime sahiptir. Sarımsağın antimikrobiyal özelliği ilk olarak 1858 yılında Louis Pasteur tarafından bulunmuştur. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda sarımsak ekstraktının antibiyotik, hipoglisemik etki, antitümör, antioksidan ve antitrombotik gibi özelliklerinin olduğu anlaşılmıştır.

Allisin sarımsağa karakteristik kokusunu verdiği gibi sarımsağın antimikrobiyal etki göstermesini de sağlamaktadır. Allisin dışında sarımsakta başka antimikrobiyal özellik taşıyan diğer bir bileşikte alojendir (Doğuç, 2007).

Tablo 2.1. Bazı Baharatların/Bitkilerin Etki Alanı ve Aktif Bileşenleri (Meyer ve diğ., 2002).

Baharat ve Bitkiler	Aktif Bileşenleri	Etki Alanları
Yenibahar	Ögenol	Küfler, mayalar
Defne	Ögenol, linalool, 1,8-sineol, umbellulon	<i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Camphylobacter</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i>
Tarçın	Sinamik aldehit, ögenol	Mayalar, bakteriler ( <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> )
Karanfil	Ögenol	Küfler, mayalar, bakteriler ( <i>Bacillus subtilis</i> )
Sarımsak	Allisin	Küfler, mayalar, bakteriler ( <i>E.coli</i> )
Biberiye	1,8-sineol, camphor, linalool	Bakteriler ( <i>Bacillus cereus</i> )

Sarımsağın bugün başta İspanya, İtalya, Mısır, Fransa, Brezilya, A. B. D, Hindistan ve Japonya, ayrıca Balkan ülkeleri olmak üzere hemen hemen bütün dünyada tarımı yapılmaktadır (Ceylan, 1997).

Son yıllarda, sarımsağın serum kolesterolünü düşürücü etkisinden dolayı kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli rahatsızlıklar için de etkili olduğu bildirilmiştir (Ali ve ark., 2000). Sarımsak ekstraktının; Gram (-) ve Gram (+) bakterilerin üremesi üzerine inhibe edici etkiye sahip olduğu (Arora ve Kaur, 1999) ve aynı zamanda antifungal etki gösterdiği belirtilmiştir (Yin ve Tsao, 1999).

### **2.1.3. Mikroorganizma kaynaklı antimikrobiyaller**

Laktik asit bakterileri antimikrobiyal özelliğe sahip çeşitli metabolitleri üretebilmektedirler. Laktik asit bakterileri türlerine, cinsine ve gelişme ortamına bağlı olarak etanol, diasetil, CO<sub>2</sub>, asetik asit, reutrein, laktik asit, laktik asit türevleri ve düşük moleküllü peptitler üretebilmektedir. Üretilen bu etken maddeler *Staphlococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.* gibi patojen özellikli mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların sporları ile vejetatif formları üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antibakteriyel etkili maddelerinin gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasının temel nedenleri arasında GRAS statüsünde olmaları ökaryotik hücrelere karşı aktif ya da toksik olmamaları genel olarak pH ve sıcaklığa karşı tolerans göstermeleridir.

Bunun yanı sıra kullanılan bakteriyosine duyarlı olmayan suşun ortamda hızla gelişmesi maya veya küfler karşısında etkisiz kalması ise söz konusu bakteriosinin gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasını sınırlayan faktörlerdendir. Ayrıca bazı koşullarda kullanılan bakteriyosinin stabilitesi ve aktivitesi olumsuz etkilenmektedir. Örneğin spesifik olmayan pretolitik enzimler, oksidasyon, ağır metaller, ortamın pH değeri, sıcaklık gibi etmenler bu duruma sebep olabilir (Şahin, 2006).

### 2.1.3.1. Nisin

İlk olarak 1923 yılında Rogers tarafından peynir üretimi sırasında yaşanan sorunlar sırasında keşfedilmiştir. Ticari olarak 1953 yılında üretilmeye başlanan nisin gıda sektöründe kullanılan en önemli koruyucu gıda katkı maddelerinden biridir. Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi tarafından GRAS statüsünde kabul edilen nisin, yaklaşık 30 yıl önce İngiltere de kullanılmaya başlandıktan sonra Avrupa, Amerika ve Çinde’de kullanılmaya başlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından kullanımı onaylanan bu koruyucu gıda katkı maddesi, kuru formda özelliğini uzun süre koruyabildiği gibi düşük pH da çözünürlüğü daha fazladır. Nisin peynir, süt, konserve gibi gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılmaktadır (Ünlütürk, 2003).

Birçok bakteriyosin sadece belirli türleri inhibe ederken, nisinin antibakteriyel spektrumunu daha genişler. Stafilokoklar, sporlu bakteriler, laktik asit bakterileri ve *Listeria monocytogenes* dahil birçok Gr(+) mikroorganizmalar üzerinde etkili, maya ve küflere karşı etkisizdir (Arauz ve ark., 2009). 1990 yılından sonra yapılan çalışmalarda nisinin bazı Gr(-) bakterilere karşı da etkili olduğu belirtilmiştir (Vandenbergh, 1993).

Nisin kendisine duyarlı olan mikroorganizmaların hücre duvarında tahribata yol açarak bakteriyosidal etki gösterir. Nisin hücre membranında porlar oluşturarak hücre içi organellerin dışarı akmasını sağlayarak ya da hücre duvarı sentezini durdurarak bakteriyosidal etkisini gösterir (Gill ve Holley, 2000).

## 2.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Etki Eden Faktörler

Birçok neden doğal antimikrobiyal maddelerin aktivitesinde değişikliğe neden olabilir. Gıdaların bileşiminde bulunan protein, yağ miktarı, tuz oranı ya da pH gibi faktörler doğal antimikrobiyallerin bakteriyosin özelliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda ortamın yağ varlığı veya yağın çeşidi esansiyel yağların antimikrobiyal özelliğini etkilediği belirlenmiştir. pH'nın da antimikrobiyal etki mekanizması üzerinde önemli bir etken olduğu bilinmektedir (Şahin, 2006).



Yapılan bir çalışmada düşük pH seviyesinin; esansiyel yağların çözünürlüğünü ve stabilitesini artırarak antimikrobiyal aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca ortamdaki NaCl miktarının artmasının da esansiyel yağlarda antimikrobiyal aktivitenin artmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bitkisel ekstrakt ya da esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi bitkinin ekstraksiyon yöntemine ve içeriğinde bulunan esansiyel yağ miktarına bağlı olarak farklılık gösterir. Bir yılın farklı zamanlarında hasat edilen ‘Lemongrass’ bitkisinin esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkisinin değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Aralık ayında ve Mayıs ayında toplanan ‘Lemongrass’ bitkisinden elde edilen esansiyel yağ üzerinde denenen mikroorganizmaların %100’ünü inhibe ederken Şubat ile Nisan ayları arasında hasat edilen ‘lemongrass’ %73-80 oranında etkili olabilmektedir (Lopez ve ark., 2005).

Mikroorganizmaların gram özellikleri de antimikrobiyal aktivite üzerinde önemli etkenler arasındadır. Yapılan bazı çalışmalarda Gr(+) bakterilerin Gr(-) bakterilere göre bitkilerden elde edilen doğal antimikrobiyallere karşı daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır (Kim ve ark.1995; Yuste ve Fung., 2002; Bagamboula ve ark. 2003; Nassar ve ark. 2004). Gr(-) bakterilerin hücre duvarı olduğu için Gr(+) bakterilere göre esansiyel yağlara karşı daha dayanıklı olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2011; Ravichandaran ve ark., 2011).

Antimikrobiyal aktivite test edilen suşa göre farklılık gösterebilmektedir. Antimikrobiyal etkisi araştırılan bitkisel ekstrakt ya da esansiyel yağların kimi mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu kimilerinin üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* suşları üzerinde 17 farklı baharat ve bitki esans yağlarının etkisinin incelendiği bir çalışmada karanfil esansiyel yağı bütün suşlar üzerinde inhibe edici etki sağlarken fesleğen kuşburnu ve mercanköşk *Shigella flexneri* CIP suşu hariç diğerleri üzerinde antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Doğal antimikrobiyallerin antimikrobiyal etki mekanizmasına oksijen, sıcaklık, süre, su aktivitesi, gıdanın katı ya da sıvı yapıda olması ve ortamın bileşenleri gibi diğer faktörlerin de etki ettiği anlaşılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda sıcaklık yükseldikçe antimikrobiyal aktivitenin de yükseldiği belirlenmiştir (Hao ve ark., 1998; Friedman

ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada birtakım yağ ve bileşenlerin *E. coli O157:H7* ve *Salmonella enterica*'da inhibitör etkileri incelenirken elma suyu 4,21,37°C gibi farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve sıcaklık yükseldikçe inhibitör etkininde arttığı belirtilmiştir Aynı çalışmada *E. Coli o157:H7* ve *Salmonella enterica* üzerinde süre faktörü analiz edilmiş 5, 60, 120 dakika gibi farklı süreler denenmiş ve antibakterial etkinin süre ile birlikte arttığı anlaşılmıştır (Friedman ve ark., 2004).

Yapılan araştırmaların bazılarında emülsiyon oluşturmak amacıyla ortama Tween 20 ve Tween 80 eklenmektedir (Mau ve ark., 2001; Bagamboula ve ark., 2003). Bazı çalışmalarda ise kullanılmamaktadır (Smith ve ark., 2001; Takikawa ve ark., 2002).

Yapılan bir çalışmada çay ağacı yağının antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve Tween varlığında antimikrobiyal etkide azalma olduğu belirlenmiştir. Bu gibi dezavantajları engellemek, en aza indirmek ve yağ-su emülsiyonlarını stabilize etmek için düşük konsantrasyonlarda bakteriyolojik agar kullanımı alternatif olarak önerilmiştir (Mann ve ark., 1998).

Gıdaların protein içeriği de antimikrobiyal etkiyi azaltmaktadır. Gıda maddesi içerisinde bulunan proteinler antimikrobiyal maddeler ile kompleks oluşturmaktadırlar. Bu sebeple antimikrobiyal etki azalmaktadır (Smith ve ark., 2001). Gıdaların düşük su aktivitesine sahip olduğu zaman antimikrobiyal maddelerin bakteriyel hücreye geçişini zorlaştırarak antibakteriyel etkiyi azalttığı bilinmektedir (Smith ve ark., 2001).

### **2.3. Fenolik Maddeler ve Antimikrobiyal Etki Mekanizması**

Fenolik maddeler bitkinin normal gelişimi sırasında salgılanan ikincil metabolitlerdir. Fenolik maddeler genel olarak bir veya birden fazla hidroksil gurup içeren bir aromatik halkaya sahip, değişik yapı ve işlevlerdeki metabolitlerdir (Robards ve ark., 1999; Naczka ve ark., 2004)

Gıdalarda bulunan fenolik maddeler kullanıldıkları ürünlerde renk, acılık, burukluk, tat, koku ve ürünün oksidatif stabilitesi gibi özelliklere etki edebilmektedir. Fenolik

maddelerin besin değeri olmamasına rağmen sağlık açısından olumlu etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. (Naczki ve ark., 2004).

Yoğunluk miktarına bağlı olarak fenolik bileşenlerin antimikrobiyal etki mekanizması da değişmektedir. Fenolik bileşikler düşük konsantrasyonda enerji üretmekle görevli olan yapıları (enzim) etkileyerek, yüksek konsantrasyonlarda ise proteinlerin yapısını bozarak etki etmektedir. İnhibisyon mekanizması ile ilgili diğer yaklaşımda ise toksik madde oluşumu ve mikroorganizma gelişimini önleyecek biçimde hücre duvarında tahribata yol açtığı ve hücre içi maddelerin hücre dışına çıkarak hücre bütünlüğünün bozulduğu ileri sürülmektedir. Hücre içinde enerji üretimi ve bazı bileşenlerin sentezinde enzim sisteminin zarar görmeside hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. (Culter, 2000; Meyer ve ark., 2002; Kim ve ark., 2004; Tassaou ve ark., 2004).

Fenolik bileşikler antimikrobiyal etkinliklerini bakteri hücrelerinde stoplazmik membran yapısını bozarak, protonların (H<sup>+</sup>) hücre dışına çıkışını baskılayarak, aktif transport sürecinde iyon hareketlerini engelleyerek ve hücre içeriğini pıhtılaştırarak gerçekleştirmektedir (Burt, 2003).

Bazı fenollerin (gallik asit p-hidroksi benzoik asit gibi) *Clostridium botulinum*'un A ve B tiplerinin sporları üzerinde etkili olduğu söz konusu sporların miktarı azaldıkça fenolik bileşenlerin etkilerinin de arttığı bildirilmiştir (Ova, 2001).

Antosiyaninler daha çok renklendirici özellikleriyle tanınmakla birlikte *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* gibi bazı bakteriler için inhibitör olma özelliğine de sahiptir (Ova, 2001).

İzosiyonatların antimikrobiyal etki gösterdiği ve proteinlerin -SH grupları ile reaksiyona girerek buna neden olduğu düşünülmektedir. Allil izosiyonat doğal olarak bulunduğu gıdalarda koruyucu olarak rol almaktadır. Ezilmiş sarımsak, taze sarımsak ekstraktı, sulu ve alkollü ekstraktları, liyofilize tozları, buhar distile yağı gibi sarımsak ürünlerinin Gr(+) ve Gr(-) bakterilere karşı geniş antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür.

## 2.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir mikroorganizma türü üzerinde in-vitro olarak etkisini belirlemek için kullanılan yöntemlerdir. Bitkilerin antimikrobiyal etkileri ile ilgili araştırma yapılırken laboratuvar kültür ortamlarından faydalanılmakta, türbidimetrik yöntemler, inhibisyon zonlarının ölçümü, biyomas ağırlıklarının belirlenmesi, mikroorganizma sayımları gibi farklı yöntemler kullanılabilir. Bununla birlikte, diğer antimikrobiyal bileşiklerdeki gibi MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları) belirlenerek antimikrobiyal etkinlik değerlendirilmektedir (Nychas ve ark., 2003; Tassaou ve ark., 2004).

### 2.4.1. Disk difüzyon yöntemi

Laboratuvarlarda antimikrobiyal etkinliğin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Bu test, kağıt disklere emdirilen antimikrobiyal maddenin duyarlılığı araştırılan mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması ilkesine dayanmaktadır. Bu sebeple; belli oranlarda antimikrobiyal madde emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan bakterilerin inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp agarı doğru difüze olurken, inoküle edilen bakteri de çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra antimikrobiyal maddenin tamamen difüze olduğu diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma antimikrobiyal maddeye ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zon çapı o kadar büyük olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı mm olarak ölçülerek, standart zon tablolarında bulunan değerler ile karşılaştırma yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlenir (Bauer ve ark., 1966).

### 2.4.2. Türbidimetrik yöntem

Bu yöntem zarar verici olmayan, düşük maliyetli, hızlı ve düşük hassasiyet seviyesine sahiptir. Mikrobiyal gelişim eğrisinin üst kısımlarını tespit etmede kullanılmaktadır. Hücrelerin farklı gelişim evrelerindeki sayısına göre adsorbanstaki farklılık

ölçülmekte ve buna göre mikrobiyal popülasyon tahmin edilmektedir (Nychas ve ark., 2003; Tassaou ve ark., 2004). Spektro-fotometrede anlamlı okumalar için  $10^6$ - $10^7$  kob / ml seviyelerinde mikrobiyal yüke ihtiyaç duyulmaktadır. Çoğalma aşamasında olan  $< 10^5$  kob / ml seviyesindeki mikro-organizmalar bu yöntem ile belirlenememekte, absorbansta herhangi bir artış gözlenememektedir. Bu dezavantajı yok etmek amacıyla belirli aralıklarla örnek alınarak bakteriyel gelişimin izlenmesi daha faydalı olmaktadır (Davidson ve Naidu., 1989; Kim ve ark., 2004).

### **2.4.3. İmpedimetrik yöntem**

İnhibitör etki gösteren maddenin gerçek zaman içindeki hareketlerini impedans ölçüm prensibi ile gözlemlemek için kullanılır. İnhibitör bileşenlerin aktivitelerini izlemek için kullanılan alternatif hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde, bakteriyel gelişim ile düşük iletkenliğe sahip besin öğelerinin yüksek iletkenliğe sahip bileşenlere dönüşmesi ile oluşan impedimetrik değişim ölçülmektedir. Türbidimetrik yöntemde olduğu gibi plak sayımları ile kalibrasyon gerektirmektedir (Nychas ve ark., 2003; Tassaou ve ark., 2004).

### **2.4.4. Geleneksel mikrobiyolojik yöntem**

Uzun sürmesi ve el becerisi gerektirmesine rağmen mikroorganizma sayımı ilkesine dayanan bu yöntem günümüzde antimikrobiyolojik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin en büyük avantajı diğer yöntemlerden daha ucuz olmasıdır. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin düşük olması, bununla birlikte kullanılan materyale bağlı olarak sonuçlarda farklılık oluşması ve inkübasyon süresinin fazla olması ise yöntemin en önemli dezavantajlarıdır (Tassaou ve ark., 2004).

### **2.4.5. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)**

Farklı konsantrasyonlarda denenen ve antimikrobiyal bileşenin mikrobiyal gelişimi tamamen durdurduğu en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

(MİK) olarak tanımlanmaktadır. MİK belirlemek için katı agar ya da sıvı besi ortamında antimikrobiyal dilüsyonlarının hazırlanması çok sık kullanılan yöntemler arasındadır (Kim ve ark.,1995; Lambert ve ark., 2000). İnkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı bir antimikrobiyalin MİK değerinin belirlenmesinde en önemli etkenlerdir. Son yıllarda geliştirilen Bioscreen Microbiological Growth Analyzer cihazı ile aynı anda çok sayıda mikroorganizma ve antimikrobiyal araştırma olanağına erişilmiştir (Tassaou ve ark., 2004).

## 2.5. Mikroorganizmalar

### 2.5.1. *Helicobacter pylori*

*H. pylori* mikroaerofilik, Gr (-), kapsülsüz ve hareketli bir bakteri türüdür. *H. pylori* görünüm olarak 2,5-5 mikrometre boyunda 0,5-1mm eninde sporsuz ve spiral şekillidir. Sahip olduğu flajeller sayesinde hareket eder. *H. pylori* midenin yüksek asitli ortamında canlılığını devam ettirebilmek amacı ile üreaz enzimi salgılayarak üreyi parçalar ve amonyağa çevirir. Bu sayede midenin zararlı ortamından kendini korur ve mide mukozası içine yerleşerek koloniler oluşturur. *Helicobacter* genusu içerisinde sadece *H. pylori* insan midesinde rahatça çoğalabilmektedir. *H. pylorinin* mide dokuları dışında diğer örneklerden izolasyonu oldukça zordur. İzolasyondaki yetersizlik; çevresel şartlara maruz kaldığı zaman morfolojisi, metabolizması ve üreme özelliklerinde gözlemlenen farklılıklardan kaynaklanmaktadır. (Tennover ve ark., 1991).

*H. pylori* yarı geçirgen dış duvar fosfolipitlerce zengin stoplazmik membran ile Gr(-) hücre duvarı yapısına sahiptir. Bu bakteri fiziksel ve kimyasal sitrese maruz kaldığı zaman kokoid forma geçer ve metabolik aktivitesini en aza indirger. Bu durumda canlılığını korur ancak kültür ortamında üreme özelliğini kaybeder. Mikroskop altında görülebilen fakat kültür ortamında üreyemediği bu durum VBNC(Viable But Not Culturable) olarak tanımlanır. Dolayısıyla özellikle gıdalarda *H. pylori* varlığını tespit etmede DNA analizi kültürel yöntemlerden daha kesin sonuç vermektedir (Vale ve ark., 2010).

*H. pylori* kolonize olduğu insanlarda aktif kronik gastrit peptik ülser ve mide kanserinin yanı sıra birçok enfeksiyonda varlığı ısıpatlanmış önemli bir patojendir. *H. pylori*'nin uzun yıllardan beri insanların mide sıvılarının içinde var olduğu bilinmesine karşın *H. pylori*'nin kronik gastirit ve peptik ülser ile olan bağı 1983 yılında anlaşılmıştır. 1983 yılında Warren ve Marshal Avustralyada yaptıkları bir çalışmada insan midesinden alınan sıvı örneklerinde spiral şeklinde mikroorganizmalar keşfetmişlerdir. Ancak bu mikroorganizmaların *Camblyobacter* türü olduğu kanısına varmışlardır. 1989 yılında ise Goodwin ve ark. bu bakteriyi *Camblyobacter* türünden tamamen ayırmış ve helikal yapısı ve midenin sıklıkla pilor bölgesinden izole edildiği için *H. pylori* adını vermişlerdir. *H. pylori* karbonhidratları fermente edemez dolayısı ile gerekli olan enerjiyi solunum ve amino asitlerin metabolize edilmesi ile sağlar (Tenover ve ark., 1991).

*H. pylori*'nin üremesi için çikolata agar, triptic soy broth, brain harth infizyon agar, wilkins chojgren agar kullanılmaktadır. Üreme pH'ları 4,9-8 aralığındadır. Optimal üreme ısıları 37 °C derecedir.

*H. pylori* enfeksiyonları dünyada oldukça yaygın olmakla birlikte enfeksiyon ile ilgili belirlenmiş birçok risk faktörü bulunmaktadır. Bunlar; düşük sosyoekonomik gelişmişlik seviyesi, eğitim seviyesindeki yetersizlikler, özellikle çocukluk dönemindeki kötü hijyen şartları, kalabalık aile yaşamı, kirli içme sularıdır. *H. pylori*ye bazı evcil hayvanlarda rastlanması farklı bir bulaşı yoluna daha işaret etmektedir. Ayrıca çocukluk döneminde hastalığın ilerlemesinde genetik faktörlerinde etkili olduğu anlaşılmıştır (Altındış ve Özdemir, 2003).

Yapılan araştırmalarda kontamine olmuş sularla yıkanan sebzelerde, hayvansal kökenli gıdalarda özellikle süt ve süt ürünlerinde *H. pylori* varlığına rastlanmıştır (Yula, 2009).

Gıdaların işlenmesi sırasında ısı işlem görmesi, içme sularında dezenfeksiyon amaçlı klor kullanımı bu bakterinin bulaşma riskini oldukça düşürmektedir. Ancak sebze ve meyveler gibi bazı gıdaların çiğ olarak tüketilmesi ya da ısı işlem sonrasında, çapraz

kontaminasyon ve suların dezenfeksiyonunun tam olarak sağlanamaması gibi sebepler enfeksiyon riskini artırmaktadır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda *H. pylori* inokule edilen et ve sütlerde bu bakterinin birkaç gün yaşamını sürdürdüğü tespit edilmiştir (Poms ve ark., 2001; Quaglia ve ark., 2007).

### 2.5.2. *Staphylococcus aureus*

İlk kez İskoç cerrah Sir Alexander Ogston tarafından 1882 yılında tanımlanmış ve mikroskopik görüntüsünden dolayı *Staphylococcus aureus* (üzüm salkımı) olarak adlandırılmıştır (Erkmen, 2010). *S. aureus* hareketsiz, katalaz pozitif, Gr(+), oksidaz negatif, fakültatif anaerob, yuvarlak ya da ovale yakın şekilli mezofil bir bakteri türüdür. Optimum gelişme sıcaklığı 37 °C ve 6-7 pH değerinde olmakla beraber ortam koşulları uygun olduğunda 7-48 °C arasında da gelişebilmektedir. Gelişebilmesi için optimum pH değeri ise 6-7 olup pH 4-10 arasında da gelişebilmektedir. Gıdalarda toksin oluşturabilmek için minimum pH istekleri vejetatif gelişme isteklerinin biraz üstündedir. Benzer durum su aktivitesinde de görülür. Minimum su aktivitesi değeri; aerob gelişme için Aw:0,83-0,86 anaerob gelişme için Aw: 0,90 olarak belirlenmiştir. Toksin oluşturabilmek için ise daha yüksek su aktivitesine ihtiyaç duyarlar. *S. aureus*'un bir diğer önemli özelliği ise %5-7 NaCl derişimine karşı dirençli olmasıdır. Bazı suşlar ise %20 oranındaki NaCl derişimine bile dayanabilmektedirler. Tuzdan başka tellurit, sodyum azid civa klorür gibi kimyasal maddelere ve neomisin polimiksin gibi bazı antibiyotiklere dirençlidirler (Erkmen, 2010).

*S. aureus*'un enteretoksin oluşturabilmesi için patojen sayısı ve çoğalma hızı önemlidir. Üretilen bu enteretoksinin gıdalarla vücuda en az 1 mikrogram alınması sonucu intoksikasyon oluşur.

*S. aureus* tarafından oluşturulan hastalık, gıda maddesinin tüketiminden 1-7 saat ortalama olarak 2-4 saat sonra oldukça kısa bir sürede ortaya çıkar. Hastalığın belirtileri bulantı, kusma mide krampları ve ishal şeklinde olup 1-2 günde iyileşme olmaktadır (Erkmen, 2010).



Bütün sıcakkanlı canlılar patojenin birinci derece kaynağı olabilmektedir. *S. aureus* en fazla burun ve boğaz boşluğunu örten mukoz dokularda bulunmaktadır. Deride en fazla da ellerde kollarda ve yüzde bulunur. *S. aureus* hava, toz ve kanalizasyon sularında bulunabildiği gibi bu patojene gıda ekipmanlarında da rastlanılmaktadır. *S.aureus* kaynaklı hastalıklar işlenmiş gıdalarda daha çok personelden ya da gıda işleme sırasında kullanılan alet ekipmandan patojen bulaşması ile meydana gelmektedir. Bu patojen birçok gıda maddesinde gelişebildiği gibi özellikle kırmızı et ve et ürünleri, tavuk eti, süt ürünleri en riskli gıda maddeleri arasındadır (Erkmen, 2010).

*S. aureus* kaynaklı enfeksiyonunun önlenmesinde en önemli noktalardan birisi ısı işlem görmüş gıda maddelerini bu işlemin ardından hızlı bir şekilde soğutulması ve +4 derecede muhafaza edilmesidir. Ayrıca bu patojen insan kaynaklı olabileceği için gıda üretim işletmelerindeki personel hijyeni patojenitenin önlenmesinde oldukça önemlidir (Erkmen, 2010).

### **2.5.3. *Bacillus cereus***

İlk kez 1987 yılında izole edilerek tanımlanmıştır. 1949 yılında ise vanilya soslarının tüketilmesi sonucunda gıda kaynaklı bir hastalık etmeni olduğu ortaya konmuştur. *Bacillus cereus* fakültatif anaerob, Gr(+), çubuklu bir bakteri türüdür. Bu bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 28-35 °C olup, 8-55 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. pH 5-6 aralığının altındaki değerlerde gelişme imkanı çok kısıtlıdır (Erkmen 2010).

*B. cereus* intoksikasyon ve enfeksiyon etkeni olan bir bakteri türüdür. Bu patojen diyarel (ishal) sendrom ve emetik (kusma) olmak üzere iki farklı zehirlenme oluşturmaktadır. Emetik tip gıda zehirlenmesine sebep olan enterotoksin 121 °C 90 dakikalık ısıtma işlemi ve 2-11 arasında değişen pH değerlerine canlılığını devam ettirebilmektedir. Diayretik tip gıda zehirlenmesinde ise kusma genellikle gözlenmez ve gıdanın alınmasından 6-15 saat sonra karın ağrısı ya da ishal gibi semptomlar

meydana gelir. Diyaretik tür intoksikasyon etkeni olan toksin ısıya karşı direnç göstermemektedir. Emetik sendrom tipik intoksikasyon olarak tanımlanmaktadır.

Bakteri toprak kökenli olmakla beraber süt ürünleri, sebzeler, et ve et ürünleri, tahıllarda ve çeşitli çiğ ve işlenmiş gıdalarda bulunabilmektedir (Erkmen, 2010).

#### 2.5.4. *Salmonella Typhimurium*

*Salmonella spp.* Enterobacteriaceae familyasında yer alan Gr(-), çubuk formunda, mezofilik, spor oluşturmeyen, çoğu sahip oldukları peritrik flagellaları ile hareketli fakültatif anaerob, katalaz pozitif, oksidaz negatif özelliktedirler (Erkmen 2011). Optimal üreme sıcaklığı 35-37°C olan Salmonellalar genellikle 5.8-47°C arasında üreyebilmekte ise de; 2-54°C'de üreyebilen generasyon süreleri daha uzun olan bazı suşları da vardır. Bakteri ısı işlemlerine duyarlıdır. Optimum gelişim pH'sı 6.5-7.5 arasında olmakla birlikte, 4.0-9.5 arasındaki geniş bir pH spektrumunda da üreyebilmektedirler. Salmonellalar 0.94-0.99 aw (su aktivitesi) değerlerindeki gıdalarda gelişebilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan inhibitör, koruyucu madde ve dezenfektanlara karşı duyarlıdır. %5 tuz konsantrasyonunda çoğalabilirken; %8 tuz konsantrasyonunda canlılığını koruyabilmektedir (Tonbak ve ark., 2017).

Hem insanlarda hem hayvanlarda neden olan türlerin başında *S. Typhimurium* ve *S. Enteriditis* gelir. Salmonella enfeksiyonlarının 3 klinik formundan biri olan gastroenterite neden olan salmonella türlerinin başında *S. Typhimurium* ve *S. Enteriditis* gelir. Gastroenteritte inkübasyon süresi 6 saat- 10 gün hastalık belirtileri ise 2-7 gün sürer. Hastalık oluşturma dozu  $10^6$ - $10^9$  kob/gr'dir ve salmonella ile bulaşmış gıda ve suyun tüketilmesiyle oluşur (Erkmen, 2010). Genel olarak salmonella enfeksiyonlarında  $10^5$ kob/g üzerinde bakteri içeren gıdaların hastalığa neden olduğu bildirilmektedir (Erkmen, 2010).

Salmonella enfeksiyonunun yayılmasında gıdalar, insanlar ve çevre arasında önemli bir etkileşim bulunmaktadır. *Salmonella* etkenleri çevresel koşullara oldukça dirençli bakteriler olup gıdalarda uzun süre canlılığını koruyabilmektedir. Gıdaya *Salmonella*

bulaşmasının üç ana yolu vardır. Birincisi *Salmonella* enfeksiyonuna maruz kalmış hayvanların et ve sütlerinin tüketilmesi. Özellikle kanatlı etleri ve yumurtaları, süt ve kırmızı et önemli kaynaklardır. İkinci yol çevreye ve sularına dışkı ya da mezbaha atıkları gibi atıkların bulaşmasıdır. Üçüncü yol ise gıdaların tüketime sunulması aşamasında çapraz kontaminasyona maruz kalmasıdır (Erkmen, 2010).

### 2.5.5. *Cronobacter sakazakii*

*Cronobacter sakazakii*, Enterobacteriaceae familyasına ait Gr(-), fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, sporsuz, flagellaları ile hareketli bir mikroorganizmadır (Chenu ve ark. 2009). *C. sakazakii*, Enterobacter *cloacae*'nin sarı pigment veren bir tipi olarak belirtilirken, 1980 yılında DNA-DNA hibridizasyonu, biyokimyasal reaksiyonları, pigment üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarındaki farklılıklardan dolayı yeni bir tür olarak isimlendirilmiştir. Japon bakteriyolog Riichi *sakazakii*"den adını almıştır (Nazarowec-White ve ark 1997).

2007 yılında Iversen ve ark., *E. sakazakii* olarak tanımlanan 210 suşun DNA profilleri ve fenotipik özellikleri incelemiş ve çalışma sonunda *Cranobacter* adında yeni bir cinsin olduğu kanısına vararak taksonomik sınıflandırmada değişiklik yapmış yeni bir cins ve 6 tür tanımlamışlardır. Bakterinin adı; bilimsel literatürlerde hem *Cronobacter sakazakii*. hem de *E. sakazakii* olarak kullanılmaktadır (Iversen ve ark., 2008; Chenu ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2011). *E. sakazakii*, TSA'da (Tryptic Soy Agarda) 24-48 saat içerisinde sarı pigmentli koloniler oluşturur. Bakterinin 25°C'de 24 ve 48 saatteki inkübasyon sonrası oluşturduğu koloni çapları sırasıyla 1-1,5 ve 2-3 mm; 36°C' de 24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan koloni çapları 2-3 mm olduğu belirlenmiştir. Ayrıca suşa bağlı olarak pigment üretimi değişmektedir (Nazarowec ve ark., 1997).

*E. sakazakii*"nin gelişim sıcaklığı 5,5-45 °C. Optimum sıcaklık aralığı ise; 37-43 °C'dir. Üremesi için en düşük sıcaklık 5,5 °C olduğundan dolayı, organizma buzdolabı sıcaklığında üreyebilmektedir (Nazarowec ve ark., 1997; Iversen ve ark., 2004).

*E. sakazakii*"nin düşük su aktivitesine karşı direnç gösterdiği saptanmıştır (Beuchat ve ark., 2009). Lin ve ark. (2007), yaptıkları bir araştırmada, su aktivitesi arttıkça ölüm

oranının hızlandığını tespit etmişlerdir. Ozmotik strese ve kurutmaya, lag fazındaki *E. sakazakii* hücrelerinin, *Enterobacteriaceae* familyasındaki diğer bakterilere göre daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Breeuwer ve ark., 2003).

*E. sakazakii*'nin doğal yaşam alanı tam olarak bilinmemekle beraber bu bakteri gıdalarda ve çevrede bulunabilmektedir. Yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyon nedeniyle söz konusu bakterinin bebek maması ve süt tozu kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Fakat bu bakterinin izolasyonu doğadan ve çevreden yapılmıştır. Bu bakteri insan ya da hayvan bağırsak florasının bir üyesi değildir. *E. sakazakii*'nin gıdalar ve çevrede klinik ortamlara göre daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Bu bakteri peynir, süt tozu, bebek mamaları, fermente edilmiş ekmek, kürlenmiş et, dana kıyma, sosis ve sebzeler gibi çok farklı gıda maddesinden izole edilmiştir (Iversen ve Forsythe., 2003; Skladal ve ark., 1993).

## **2.6. Çalışmada Kullanılan Standart Antibiyotik Diskler**

### **2.6.1. Tetracycline (Te30)**

Tetracycline (Te30), mikroorganizmalar üzerinde etkili olan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Tetrasiklinler *Streptomyces aureofaciens* olarak isimlendirilen bir bakterinin fermentasyonu sonucu keşfedilmiştir. Geniş spektrumlu olması bazı bireylerde daha az toksik olması ve daha tolere edilebilir olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bakteri ribozomlarının 30s alt ünitesine bağlanarak t- RNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe ederler (Baltacıoğlu ve Akalın, 2006).

### **2.6.2. Cephalixin (Cl 30)**

Cephalixin (Cl 30), birçok Gr(+) ve enterik organizma üzerinde etkilidir. Sindirim sistemindeki yararlı floraya zarar vermemesi ya da çok az zarar vermesi sebebiyle kullanımı tercih edilmekte olan bir antibiyotik türüdür (Christine ve ark., 1978).

## 2.7. Biberiye ve Sarımsak ile İlgili Önceki Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada sterilize edilmiş süte *H. pylori* inokule edilmiştir. Oda sıcaklığında ve 4°C’de gelişimi takip edilmiş ve her iki sıcaklıkta bulunan sütlerde *H. pylori* gelişimi gözlenmemiş olup 4 gün sonunda sütteki *H. pylori* sayısı 1 log azalmıştır (Karim ve Maxwell, 1989).

Quaglia ve ark (2007) yaptıkları çalışmada İtalyanın güneyinden toplanan 400 adet çiğ koyun, keçi ve inek sütlerinde *H. pylori* aranmış ve toplamda 139 örnekte *H. pylori* varlığına rastlanılmış olup 160 adet çiğ keçi sütü örneğinin 41 tanesinde *H. pylori* varlığı tespit edilmiştir.

Bazı bitki ve baharatların antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada biberiye ve temel bileşenlerinin inhibitör etkilerinin, Gr(-) bakteriler üzerine Gr(+) bakterilere oranla daha etkili olduğunu tespit edilmiştir (Zaika, 1988).

Pintore ve ark (2002) biberiyeden ekstre ettikleri eterik yağların Gr(+) bakteriler üzerine Gr(-) bakterilere kıyasla daha kuvvetli antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Başka bir çalışma da biberiyenin uçucu yağının *L. monocytogenes* ve diğer patojenlere karşı bakterisidal aktivite gösterdiği bulunmuştur (O’Gara ve ark., 2000).

Biberiye yağının antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada bakterilere (*E. coli* ve *S. epidermidis*) karşı zayıf bir etki gösterirken bazı mantar suşlarına (*S. cerevisiae* 0425 52C ve 0425 delta/1) daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir (Schelz ve ark., 2006).

Valero ve ark (2003), havuç suyundaki *B. cereus*’a karşı 11 uçucu yağın antibakteriyel etkisini inceledikleri çalışmalarında biberiye yağının lag fazı uzattığını belirtmişlerdir. Çeşitli bitkilerin kullanıldığı başka bir çalışmada; biberiyenin *S. aureus* üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Duman ve ark., 2008).

Taurin, biberiye, a-tokoferol ve C vitamininden meydana getirilen karışımların modifiye atmosferde paketlenmiş bifteklerde oksidatif stabiliteye etkilerini araştırmışlar, biberiye ve C vitamini karışımının biftek rengi ve mikrobiyal yoğunluğu üzerindeki etkisinin çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Djenanane ve ark., 2002).

Biberiye ekstraktının kullanımının et ve et ürünlerindeki antioksidan etkisi ile birlikte antimikrobiyal etkisi de dikkat çekmektedir. Kullanılan doğal bitki ve uçucu yağların inhibitör özellikleri çalışmalarla belirlenmiştir (Elgayyar ve ark., 2001; Santoyo ve ark., 2005).

Biberiye uçucu yağlarının birtakım Gr(+) ve Gr(-) bakteriler ile küfler üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu, biberiyede bulunan karnosol, ursolik asit ile rasmonolün antimikrobiyal özellik gösterdiği farklı araştırmalarda belirtilmiştir (Collins ve Charles., 1987).

Biberiye ekstraktının antimikrobiyal özelliğe sahip olup olmadığı *S.aureus*, *E.coli*, *Salmonella enriditis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus mutans*, *Ervinia carotovora*, *Bacillus cereus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L.monocytogenes* bakterilerinde ve *Penicillium roquefortii*, *Botrytis cinerea* küflerinde araştırmıştır. Sonuçta 30 °C'de 24 saat sonunda biberiye ekstraktının *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *L. mesenteroides*, *S. mutans*'ı tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir. Biberiye ekstraktının Gr(+) *B. cereus*'a karşı en etkili antimikrobiyal olduğu ve %0,06 biberiye ekstraktı ile Gr(+) *B. Cereus* tamamen inhibe olduğu belirtilmiştir. Mikroorganizmaların inhibisyonu için minimum konsantrasyonun *S. mutans* için %0,5, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides* için ise %1 olarak belirtilmiştir (Campo ve ark., 2000).

Fernandez-Lopez ve ark (2005) biberiye ekstraktının, sığır etinden elde edilen köftelerde mikrobiyal yüke etkisini bir çalışmada incelemişler, köftelere 4 adet Gr (+) (*Brochotrix thermosphacta*, *Cornobacterium pissicola*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*) ve 2 adet Gr (-) bakteri (*Pseudomonas fluorescens* ve *Serretia liquefaciens*) bakteri bulaştırmışlardır. 4°C'de 12 günlük inkübasyon sonunda biberiye

ekstraktının *Brochothrix spp.* dışında tüm bakterilerin gelişimini tamamen engellediğini belirlemişlerdir.

Biberiye, sarımsak ve kekik uçucu yağı eklenmiş peynir altı suyu proteininden elde edilen yenilebilir filmlerin *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* ve *L. plantarum* üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara karşı, kekik yağı ve biberiye yağı katkılı yenilebilir filmlerin inhibitör etkilerinin çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (Seydim ve Sarıkuş., 2006).

Ahn ve ark. (2007), biberiye ekstraktı ve BHA/BHT ilavesinin pişmiş bifteklerde mikrobiyal flora ve yüke etkisini incelemişlerdir. Bifteklerin bir kısmına % 0,02 oranında BHA/BHT (1:1) karışımı, diğer kısmına ise % 1 oranında biberiye ekstraktı eklenmiş ve ısıtma işlemi tabii tutularak 4°C'de 9 gün inkübe edilerek *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophila* üzerine antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Biberiye ekstraktı *A. hydrophila* haricinde tüm patojen bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermiştir.

Biberiye, kekik, nane ve çay uçucu yağlarının patojen bakteriler üzerine inhibitör etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise bu antimikrobiyallere ek olarak ciproflaxocin/amphotericin B karışımı da eklenmiştir. Biberiye + ciproflaxocin/amphotericin B kombinasyonu *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Candida albicans* üzerindeki inhibitör etkisi diğer uçucu yağ ve antimikrobiyal madde kombinasyonlarından daha etkili olduğu belirtilmiştir (Vuuren ve ark., 2008).

Azzous ve Bullerman (1982), *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerine karşı % 2 konsantrasyonundaki sarımsağın etkisini incelemişler ve sarımsak varlığında *P. patulum*' un 5 gün, *A. Flavus*, *A. ochraceus*, *P. citrinum*, *P. roqueforti*' nin 6 gün, *A. parasiticus*' un 7 gün ve *Penicillium sp.* M 46' nın da 10 gün gecikerek üremeye başladıklarını bildirmişlerdir.

Kumar ve Gupta (1984), yaptıkları çalışmada sarımsak ekstraktı enterotoksijenik *Staphylococcus aureus*' un 7 suşuna karşı inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bütün kültürler için minimum letal konsantrasyon (MLC) ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) degerleri saptanmıştır. Sarımsağın enterotoksijenik *S.aureus* izolatlarının bazılarında bakteriyostatik bazılarında da bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bir başka araştırmada ise sarımsak (*Allium sativum L.*) ve soğan (*Allium cepa L.*) ekstraktlarını; Gr (+) organizmalar, Gr (-) organizmalar ile mantarlara karşı test edilmiştir Test edilen organizmaların çoğunda, belirgin bir inhibisyon görülmüştür. Ekstraktların Gr (+) ve Gr (-) organizmalara karşı aktivitesi, minimum bakteriyostatik ve bakterisidal konsantrasyonlar ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda sarımsak ekstraktı, soğan ekstraktından daha yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Elnima ve ark., 1983),

Hughes ve ark (1991) sarımsak (*Allium sativum L.*), fil sarımsağı (*Allium ampeloprasum L.*), farklı soğan (*Allium cepa L.*) türleri, soğan ve sarımsak tozları, sarımsak jelatin kapsülleri, sarımsak tabletleri ve sarımsak drajelerini kullanarak mantar ve bakterilerden oluşan çeşitli test mikroorganizmaları ile çalışmalar yapmışlardır. Araştırma sonucunda sarımsağın, farklı soğan türlerinden daha yüksek antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada ezilmiş taze sarımsak homojenatının aktif bileşeni olan allisinin çeşitli antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğunu; allisinin saf halde G (-) ve Gr (+) bakterilerin geniş bir grubuna karşı antibakteriyal aktivite, *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivite, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* gibi bazı başlıca insan bağırsak parazitlerine karşı antiparazitik aktivite ve antiviral aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca allisinin başlıca antimikrobiyal etkisinin, çeşitli enzimlerin thiol grupları ile kimyasal reaksiyonu nedeniyle olduğunu ifade etmişlerdir (Ankri ve Mirelman, 1999).

Anesini ve Perez (1993), Arjantin halk tıbbında kullanılan 132 bitkiden elde ettikleri ekstraktları Penisilin G dirençli *S. aureus*, *E. coli* ile *Aspergillus niger*'e karşı agar difüzyon metodunu kullanarak bu organizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini



incelemişler ve inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. Sarımsağın *S. aureus* ve *A. niger*'e karşı inhibisyon etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Hazır (2004), sarımsak ekstraktının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisini agar difüzyon ve tüp dilüsyon metotlarını kullanarak test etmiştir. Yapılan çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* için hiçbir inhibisyon zonunun gözlenmediği, *E. coli*, *Bacillus anthracis* ve *C. albicans* için ise sarımsak ekstraktının güçlü inhibisyon etki gösterdiğini bildirmiştir.

Başka bir çalışmada ise sarımsağın kalp damar hastalıklarında, kan basıncını düzenleyici, kan şekeri ve kolesterolü düşürücü bakteriyel, viral, mantar ve paraziter enfeksiyonlara karşı etkisi, bağışıklık sistemini güçlendirici, antitümör ve antioksidan özelliğini vurgulamışlardır. Sarımsağın antibakteriyel ajan olarak *H. pylori* üzerine etkili olduğu ve bu etkininde sarımsağın içerisindeki allicinden ileri geldiği bildirilmiştir (Ayaz ve ark., 2007).

## **BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **3.1. Materyaller**

#### **3.1.1. Baharat örnekleri**

Çalışmada kullanılacak biberiye ve sarımsak, ön denemeler yapılarak birçok bitki ve baharat arasından seçilmiştir. Ön denemelerde 16 farklı bitki örneğinin (defne yaprağı, çam yaprağı, ardiç yaprağı, ardiç meyvesi, laden ekstresi, zeytin embriyosu ekstresi, biberiye, kudret narı, defne tohumu yağı, çörek otu yağı, Antep fıstığı yağı, brokoli, karnabahar, soğan ve sarımsağın) antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan sarımsak ve biberiye baharatları, Sakarya'da bulunan yerel bir marketten temin edilmiştir.

#### **3.1.2. Ekstraksiyon materyal ve solusyonları**

Çalışmada biberiyenin ekstraksiyon hazırlığı aşamasında 50ml-250ml'lik beherler AND GR-200 hassas terazi, parafilm ve kaba filitre kağıdı kullanılmıştır. Çözücü olarak metanol (MeOH), MeOH'ın uçurulması işlemi için R-215 rotary evaporatör kullanılmıştır. Sarımsak ekstraktının eldesi aşamasında ise; sarımsak ezeceği, sarımsak püresinde bulunan büyük yapılı partiküllerin uzaklaştırılması için kaba filitre kağıdı, Hettich Universal 320R soğutmalı santrifüj ve soğuk sterilizasyon için 0,22 µm'lik filitrelerden yararlanılmıştır.

#### **3.1.3. Bakteri kültürleri ve kültür ortamları**

Bu çalışmada kullanılan; *H. pylori*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *E. sakazakii*, *S. aureus* olmak üzere beş adet gıda kaynaklı patojen bakteri kültürü, Sakarya Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakterilerin stok kültürleri; %15 gliserol içeren besiyerinde, -80 °C’de muhafaza edilmiş ve kullanım aşamasında Tryptic Soy Agarda (TSA)’ya çizilip 37 °C inkube edilerek canlandırılmıştır. Laboratuvar çalışmaları süresince besiyeri Tryptic Soy Broth (TSB) ve (TSA) (Merck KgaA, Darmstadt, Almanya) besi yerleri kullanılmıştır. Bakteri yoğunluğunun ayarlanmasında ise Mc Farland (Biosan-1B) cihazından yararlanılmıştır. Antibiyotik olarak Cephalexin 30 (Bioanalyse Ce30) ve Tetracycline 30 (Bioanalyse Cl30) ve nisin (Sigma N5764, from *Lc. lactis*) bakteriyosini kullanılmıştır.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Biberiye ekstraktının elde edilmesi**

Çalışmada kullanılan biberiye bitkisi öğütücüde öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen biberiye, darası alınmış 100 ml’lik beher içerisinde hassas terazide tartılmıştır ve üzerine 70 ml MeOH ilave edilmiştir. Beherin üzeri kapatılarak, 24 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Daha sonra süzdürme işlemi için uygun bir erlen üzerine, içerisine kaba filtre kağıdı konan huni yerleştirilmiştir. Hazırlanan ekstrakt süzildükten sonra evaporatörde MeOH uçurulmuştur (Radin, 1966).

Erlen içerisinde kalan ekstrakt spatul ile alınıp, üzerine %10 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek 1000 ppm’e ayarlanmıştır. Ekstrenin tamamen karışması sağlanıncaya kadar çalkalanmış ve seyreltileri hazırlanmıştır. Elde edilen ekstrakt soğuk sterilizasyon için şırınga yardımı ile alınarak 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiş ve steril bir tüp içerisine konulmuştur. Daha sonra kullanılmak üzere -80 derecede saklanmıştır.

#### **3.2.2. Sarımsak ekstraktının elde edilmesi**

50 gram sarımsak soyularak dişlerine ayrılmış ve sarımsak ezeceğinde ezilmiştir. Elde edilen sarımsak püresine 100 ml steril distile su ilave edilmiş, manyetik karıştırıcıda 60 dak. karıştırılmıştır. Karışım buzdolabında iki saat bekletilmiştir. Daha sonra büyük

partikülleri uzaklaştırmak için karışım kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Süzölen kısım 4500 rpm de 15 dak. santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki sıvı kısım pipet yardımıyla alınmış, dipteki tortu ise ortandan uzaklaştırılmıştır. Biriktirilen ekstrakt 0,22 µm'lik enjektör ucu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiş ve steril tüp içerisinde -80 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir (Rode ve ark.,1989).

### **3.2.3. Bakteriyal yoğunluğun ayarlanması**

Yapılan çalışmada ml'sinde yaklaşık  $10^6$  düzeyinde bakteri içeren bakteriyal süspansiyon kullanılmıştır (Özcan ve erkmen 2001, Hazır 2004). Vidalı tüplerde bulunan çalışma kültürünün bakteriyal yoğunluğu 0,5 Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$ ) olacak şekilde Mac Farland cihazıyla (Biosan 1B) ayarlanmıştır. Daha sonra seyreltme yöntemi ile tüplerdeki mikroorganizma sayısı  $10^6$  kob/ml olacak şekilde seyreltilmiştir.

### **3.2.4. Nisin çözeltisinin hazırlanışı**

Nisin stok çözeltisinin hazırlanması için çalışmada %2,5 saflıkta ve yaklaşık 1000 IU/mg aktivitesinde toz nisin kullanılmıştır. Toz nisinden 1 g tartılarak 50 ml 0,02N HCl içerisinde çözdürölmüştür (20mg/ml). Elde edilen çözelti 0,22 µm'lik filitreden geçirilerek sterilize edilmiş ve seyreltilerek kullanılmıştır (Gönöl, 2017).

### **3.2.5. Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metotlar**

Sarımsak ve biberiyenin antibakteriyal etkisinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi ve 96 kuyucuklu mikrodilüsyon metodu kullanılmıştır.

#### **3.2.5.1. Disk difüzyon yöntemi**

-80 °C'de bulunan stok bakterilerden öze ile alınıp, örnekler TSA besiyerine ekilerek 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. İki kez aktifleştirilen bakterilerin peptonlu su çözeltisinde süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteriyel süspansiyonun türbiditesi

pepton çözeltisinde McFarland cihazı ile 0.5'e ayarlandıktan sonra  $10^6$  kob/ml seviyesine seyreltilmiştir. Bakteriyal süspansiyonlardan otomatik pipet yardımı ile 100 µl alınarak, TSA besiyeri üzerine dökülmüş ve steril öze yardımı ile besiyerine yayılması sağlanmıştır. Bakteri süspansiyonun katı besiyerine yayılmasından sonra 6 mm çapında steril diskler besiyerine yerleştirilmiştir. Daha öncesinde hazır hale getirilen ekstraktlardan sarımsak için 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranları, biberiye için ise; 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm ve 31.25 ppm konsantrasyonları hazırlanmış ve 10 µl'lik otomatik pipet aracılığı ile disklerin üzerine eklenmiştir. Hazırlanan petripler 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmış, ardından disk etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür. Yapılan bu işlem iki paralel, 3 tekerürlü olarak tekrarlanmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır (Sağdıç ve Özcan, 2003).

### 3.2.5.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Bitkilerden elde edilen ekstraktların ve antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasında mikrodilüsyon metodu kullanılmıştır. Antimikrobiyal testler için, 96 adet U tabanlı kuyucukları olan, steril mikrodilüsyon plakları (Brand) kullanılmıştır.

-80°C'de bulunan stok bakteri çözeltileri, oda sıcaklığına getirilerek çözülmeleri sağlanmıştır. Öze ile alınan örnekler TSA besiyerine ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan bakterilerin %0,1 peptonlu su çözeltisinde süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteriyel süspansiyonun türbiditesi McFarlandı cihazı (Den 1B) ile 0.5'e ayarlanmış ve daha sonra seyreltilmiş  $10^6$  kob/ml seviyelerine getirilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi araştırılan sarımsak ekstraktının 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranında biberiye ekstraktının 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125ppm, 62,5 ppm oranında konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Besiyeri yeri olarak kullanılan olan TSB hazırlanarak, 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. 96 kuyucuklu mikropalakların A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 kuyucuklardan F1 ve G1 negatif ve pozitif kontroller olarak belirlenmiştir. Daha sonra otomatik pipetle 95 µL TSB, 5 µL bakteri, 100 µL antibakteriyel ekstrakt ilave edilmiştir. 96

kuyucuklu plakların üzeri steril etiket ile kapatılarak 37 °C’de titreşimli inkubatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bir kuyucuktan 100 mikrolitre örnek alınarak TSA üzerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda bakteri üremesinin olduğu konsantrasyonlara göre minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir (Şahin ve ark., 2003).

### **3.2.5.3. Tween 20 varlığında ortamın yağ içeriğinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi**

Yağın antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini belirlemek üzere %0, 10 ve 20 ayçiçek yağı içeren TSB hazırlanmıştır. Hazırlanan TSB içerisine emülsiyon oluşturması için %1,5 oranında tween 20 katılmıştır. Hazırlanan TSB 121°C’de 15 dakika bekletilerek steril hale getirilmiştir. -80 derecede bulunan stok bakteri çözeltileri oda sıcaklığına getirilerek çözümleri sağlanmıştır. Öze ile alınan örnekler TSA besiyerinde ekilerek 37°C’de 24 saat inkübasyonda kalmıştır. İnkübasyon sonunda çoğalan bakterilerin peptonlu su çözeltilerinde süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonunun türbiditesi pepton çözeltilerinde McFarlandı cihazı ile ayarlandıktan sonra, karşılaştırılarak  $10^3$  kob/ml seviyesine getirilmiştir (Şahin, 2006).

96 kuyucuklu mikrop plakların A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 kuyucukları bitki ekstraktları için ve F1, G1 kuyucukları ise negatif ve pozitif kontroller olarak belirlenmiştir. F1 kuyucuğuna sadece TSB besiyeri inoküle edilmiş ve inkübasyon sonunda burdan alınan örnek besiyeri yerine geçilerek sterilizasyon kontrolü G1 kuyucuğuna ise TSB besiyeri ve bakteri örneği inoküle edilerek bakterilerin sağlıklı bir şekilde üreyip üreyemedikleri kontrol edilmiştir. Daha sonra otomatik pipetle 95 µL TSB, 5 µL bakteri süspansiyonu, her bir kuyucuğa sırası ile 100 µL 250ppm, 125ppm, 62,5ppm, 31,25ppm, 15,625ppm oranlarındaki biberiye ekstraktı eklenmiştir. Aynı şekilde sarımsak ekstraktı 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64’e kadar seyreltilmiş ve kuyucuklara ilave edilmiştir. 96 kuyucuklu mikrop lakanın üzeri steril etiket ile kapatılarak 37 °C de titreşimli inkubatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bir kuyucuktan otomatik pipet yardımı ile 10 mikrolitre örnek alınarak bölmelere ayrılan TSA üzerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan

petrilerdeki bakteri gelişimi gözlenerek sonuçlar yorumlanmıştır (Şahin ve ark., 2003; ISO 7218).

#### **3.2.5.4. Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi**

Emülsiyon oluşturmak için yağ içeren sıvı kültür ortamlarına Tween 20 (polyoxyethylene (2) sorbitan monolaurate)'nin eklendiği şartlarda Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Şahin, 2006).

Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisinin olup olmadığını belirlemek için sarımsak ve biberiye bitkisine en dirençli olan *S. aureus* ve *S. Typhimurium* için % 0 ve % 1,5 Tween 20 varlığında %0 ve % 20 yağ içeren TSB ile 125 ppm biberiye ekstraktı ve 1/8 oranında seyreltilen sarımsak ekstraktı hazırlanmış ve madde 3.2.5.3'deki yöntemin aynısı uygulanmıştır.

#### **3.2.5.5. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara bazı antibiyotiklerin etkisi ile biberiye ve sarımsak ekstraktlarının aktivitesinin karşılaştırması**

-80 °C'de bulunan bakteri stokları oda sıcaklığına getirilerek çözümleri sağlanmıştır. Bakteri örnekleri TSA besiyerine ekilip, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak iki kez aktive edilmiştir. Aktive edilen bakteriler, %0,1 lik peptonlu su çözeltisinde McFarland cihazıyla  $10^6$  kob/ml seviyelerine ayarlanmış, hazırlanan bu bakteriyal süspansiyonlardan otomatik pipet ile 100 µL alınarak, TSA besiyeri üzerine dökülmüş ve steril öze yardımı ile besiyerine yayılmıştır. Daha sonra 6mm çapındaki Cephalexin (Cl 30) ve Tetracycline (Te30) antibiyotik steril diskleri besiyerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan petriler 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonda tutulmuş, ardından disk etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür.

### 3.2.5.6. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara nisin'in antimikrobiyal etkisi

-80 °C'de ki bakteri stokları oda sıcaklığına getirildikten sonra öze ile alınan örnekler TSA besiyerinde ekilerek 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmış ve inkubasyon sonucunda çoğalan bakterilerin peptonlu su çözeltisinde süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteriyel süspansiyonun türbiditesi McFarland cihazı 0.5'e ayarlanmış sonra seyreltilerek ile  $10^6$  kob/ml seviyelerine getirilmiş, bu bakteriyel süspansiyonlardan otomatik pipetle 100 µL alınarak TSA besiyeri üzerine dökülmüş ve steril özeyle besiyerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra 6 mm çapında steril diskler besiyerine yerleştirilmiştir. Madde 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan nisin çözeltisinden 15 µL otomatik pipet ile besiyerlerinde bulunan diskler üzerine ilave edilmiştir (Şahin, 2006).

### 3.2.5.7. İstatistiksel deneme modeli

Analiz sonuçlarına ilişkin verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Minitab 18 paket programı kullanılarak, Anova-General Linear Modelden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.



## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Elde Edilen Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Disk Difüzyon yöntemi ile sarımsak ve biberiye ekstraktlarının gıda kaynaklı patojenler olan *H. pylori*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii* ve *S. aureus* bakterilerinin ekilmiş olduğu petrilere oluşturduğu zonlar ölçülerek ortalamaları alınmıştır.

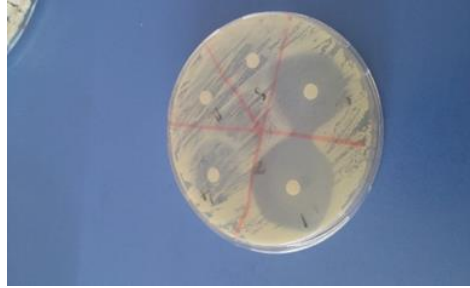
#### 4.1.1. Sarımsak ekstraktının inhibisyon zonları

Araştırmada kullanılan bakteriler üzerine sarımsak ekstraktının etkisi Disk difüzyon yöntemi kullanılarak, petrileredeki kağıt diskin çevresinde oluşan zonlar ölçülerek, ortalamaları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Sarımsak Ekstraktının Oluşturduğu Ortalama İnhibisyon Zonları (mm)

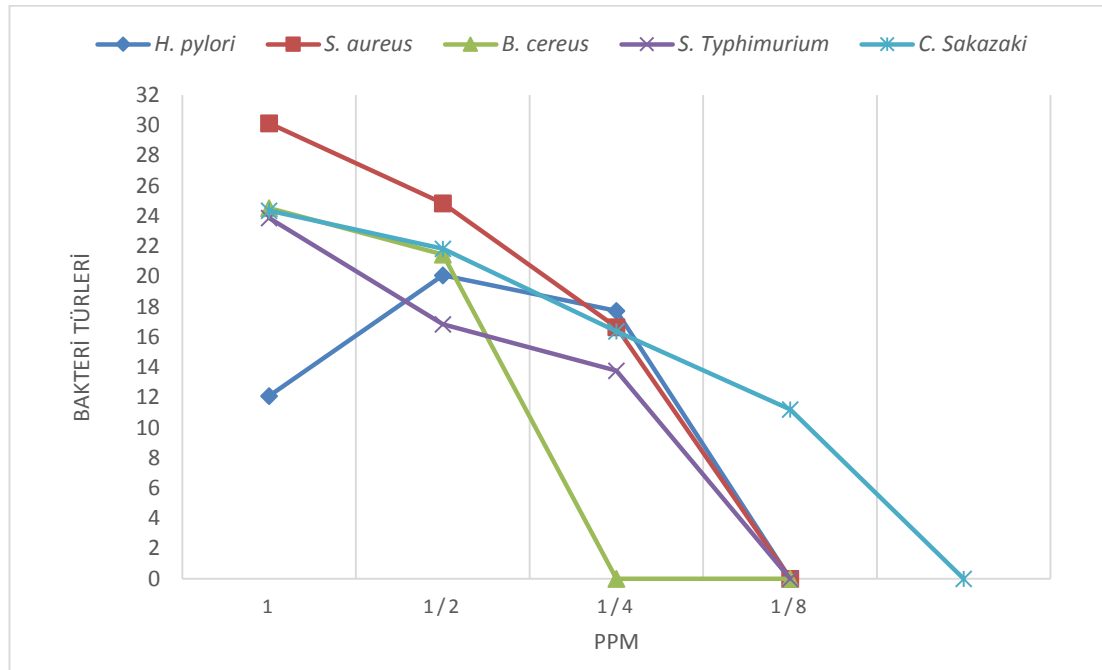
Sarımsak ekstraktı	<i>H. pylori</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
1/1	12.10	30.13	24.53	23.86	24.36
1/2	20.07	24.83	21.46	16.83	21.83
1/4	17.73	16.65	-	13.76	16.36
1/8	-	-	-	-	11.20
1/16	-	-	-	-	-

Tablo 4.1.'den de görüldüğü üzere, 1/1 ve 1/2 seyreltilerinde sarımsak ekstraktı tüm bakteri suşlarında zon oluşturmuştur. Sarımsak ekstraktının 1/1 konsantrasyonda en yüksek zon değeri, 30,13mm ile *S. aureus* üzerinde görülmüş; bunu sırasıyla *B. cerus*, *C. sakazakii* ve *S. Typhimurium* izlemiştir. 1/8 konsantrasyonda ise sadece *C. Sakazakii* üzerinde 11.2 mm zon ortalaması elde edilmiştir. Sarımsak ekstraktının *B. cereus* üzerindeki etkisi Şekil 4.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Sarımsak ekstraktının *B. cereus* üzerindeki etkisi

Seyreltilmemiş sarımsak ekstraktı için en yüksek zon; 30.13 mm ile *S. aureus* üzerine olmuş; bunu sırasıyla 24.53 mm ile *B. cereus*, 24,36 mm zon çapı ile *C. Sakazakii*, 23,86 mm ile *S. Typhimurium*, 12,10 mm ile *H. pylori* takip etmiştir. Sarımsak ekstraktının patojenler üzerindeki etkileri Grafik 4.1.'de görülmektedir.



Grafik 4.1. Sarımsak ekstraktının patojenler üzerindeki etkileri

Yapılan bir çalışmada da Doğuç (2007), sarımsak ekstraktının *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* üzerinde inhibitör etki gösterdiğini bildirmiştir; *S. aureus* için 34 mm inhibisyon zonu *S. Typhimurium* içinse 23 mm inhibisyon zonu oluşturarak çalışmamıza paralel sonuçlar vermiştir. Ayrıca bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da *S. aureus* disk difüzyon yönteminde en yüksek zonu vermiştir.

Bu sonuca benzer şekilde Ayaz ve Alpsoy( 2007), sarımsağın antibakteriyel ajan olarak *H. pylori* üzerine etkili olduğunu ve bu etkinin de sarımsağın içerisindeki allıcinden ileri geldiğini bildirmiştir.

Anesini ve Perez (1993) de, 132 bitki ekstraktı ile yaptıkları araştırmada benzer şekilde; sarımsağın, *S. aureusa* karşı inhibisyon etki gösterdiğini ifade etmişlerdir.

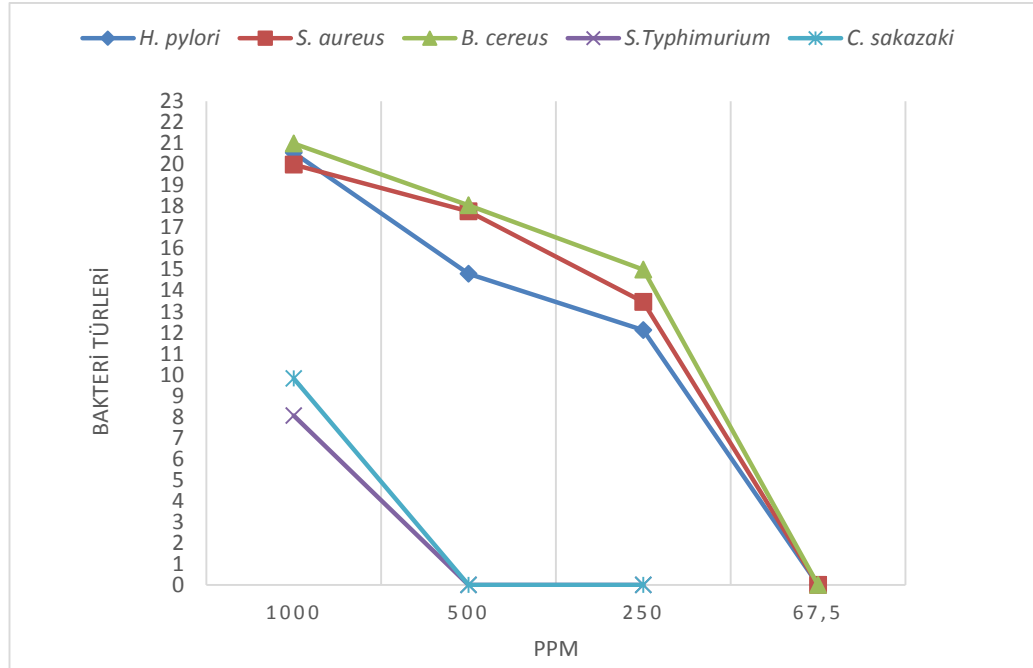
#### 4.1.2. Biberiye ekstraktının inhibisyon zonları

Tablo 4.2.'den de görüldüğü gibi; 1000 ppm biberiye ekstraktı tüm bakteri suşlarında zon oluşturmuş olup, en yüksek zon değeri 21.00 mm ile *B. cereus* üzerinde tespit edilmiştir. En düşük zon ortalaması ise 8.06 mm ile *S. Typhimurium* üzerinde görülmüştür.

Tablo 4.2. Biberiye Ekstraktının Oluşturduğu Ortalama İnhibisyon Zonları (mm)

Biberiye ekstraktı (ppm)	<i>H. pylori</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
1000	20.56	20.00	21.00	8.06	9.83
500	14.80	17.77	18.06	-	-
250	12.13	13.46	15.00	-	-
125	-	-	-	-	-

250 ppm düzeyindeki biberiye ekstraktı *H. pylori*, *S. aureus* ve *B. cereus*'da sırasıyla 12.13 mm, 13.46 mm, 15.00 mm çapında zonlar oluşturmuştur. *S. Typhimurium* ve *C. sakazakii* üzerinde ise 500-125 ppm biberiye konsantrasyonlarında zon görülmemiştir. İnhibisyon zonları kıyaslandığında biberiye ekstraktına en dirençli bakteriler *C. sakazakii* ile *S. Typhimurium* olmuştur. Biberiye ekstraktının patojenler üzerindeki etkileri Grafik 4.2.'de verilmiştir.



Grafik 4.2. Biberiye ekstraktının patojenler üzerindeki etkileri

Campo ve ark. (2000), yaptıkları araştırmada; 30°C’de 24 saat sonunda biberiye ekstraktı *B. cereus* üzerinde inhibitör etki göstermiş, *B. cereus*’un biberiye ekstraktına karşı en hassas patojen olduğu ve %0,06 biberiye ekstraktı varlığında tamamen inhibe olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada da *B. cereus* en yüksek zonu vererek biberiye ekstraktına karşı en hassas bakteri olmuştur.

Yapılan bir başka araştırma sonucunda *S. aureus* dahil test edilen mikroorganizmalara karşı, kekik yağı ve biberiye yağı katkılı yenilebilir filmlerin yüksek inhibitör etki gösterdikleri saptanmıştır (Seydim ve Sarıkuş, 2006). Yapılan bu çalışmada da biberiye ekstraktı *S. aureus* üzerinde inhibe edici etki göstermiştir.

Pintore ve ark. (2002), biberiyeden ekstre ettikleri eterik yağların Gr (+) bakteriler üzerine Gr (-)’lere kıyasla daha kuvvetli antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde Gr (+)’ler üzerinde daha çok etki elde edilmiştir.

Başka bir araştırmada, biberiye ekstraktı ve BHA/BHT ilavesinin pişmiş bifteklerde, 15ıl işlem uygulandıktan sonra 4°C’de 9 gün depolama süresince antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Biberiye ekstraktı ilavesi *A. hydrophila* dışındaki *S.*

Typhimurium dahil diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisi saptanmıştır (Ahn ve ark., 2007). Gerçekleştirilen bu çalışmada da 1000 ppm Biberiye ekstraktının *S. Typhimurium* dahil çalışılan tüm bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

#### 4.1.3. Bazı standart antibiyotiklerin çalışma bakterilerine antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Çalışmadaki bakterilere karşı 2 farklı antibiyotik disk (Cephalexin 30 ve Tetracycline 30) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kıyaslandığında; bu çalışmada kullanılan sarımsak ekstraktı, *H. pylori*, üzerinde cephalixin (Cl30) kadar zon oluşturamamıştır. *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii* ve *B. cereus* üzerinde ise sarımsak ekstraktı Cl30 antibiyotiğinden daha etkili olmuştur. Te30 antibiyotiğine karşı ise *H. pylori*'de daha küçük zon oluşurken, çalışmada kullanılan diğer patojenler üzerinde sarımsak ekstraktı daha büyük zonlar oluşturarak daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir (1000 ppm biberiye ekstraktının patojenler üzerindeki zonları; *H. pylori* 20.56 mm, *S. aureus* 20 mm *S. Typhimurium* 8.06 mm, *C. sakazakii* 9.83 mm, ve *B. cereus* 21 mm'dir).

Tablo 4.3. Standart Antibiyotik Disklerin Oluşturdukları Ortalama İnhibisyon Zonları (mm)

Standart Antibiyotik disk	<i>H. pylori</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
Cephalexin(Cl30)	22.70	19.40	17.00	19.70	21.00
Tetracycline(Te30)	31.50	25.00	19.70	26.60	24.50

Biberiye ekstraktı ise; *H. pylori*, *C. sakazakii* ve *S. Typhimurium* üzerinde Cl30'dan daha küçük zon oluştururken, *S. aureus* ve *B. cereus* üzerinde ise sırasıyla 20 mm-21 mm ile söz konusu antibiyotikden daha etkili olmuştur. Te30 antibiyotiği ile karşılaştırma yapıldığında ise çalışmada kullanılan tüm potojenler için, biberiye ekstraktının daha az etkili olduğu görülmüştür. Cl30 ve Te30'nin *H. pylori* üzerindeki etkisi Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Cephalexin30 (Cl30) ve Tetracycline30 (Te30)'nin *H. pylori* üzerindeki etkisi

## 4.2. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal testler için, 96 adet U tabanlı kuyucuklara sahip, steril mikrodilüsyon plakları (Brand) kullanılmıştır. 5 farklı patojenin, sarımsak ve biberiye ekstraktında üremelerinin gözlemlenmediği sidal konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlardan bir önceki konsantrasyon ise MİK değeri olarak değerlendirilmiştir.

### 4.2.1. Biberiye ekstraktının MİK değerleri

Biberiye ekstraktının 96 kuyucuklu mikrodilüsyon metodu kullanılarak antibakteriyal etkisine ait sonuçlar Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Biberiye Ekstraktının 96 kuyucuklu Mikrodilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Biberiye Ekstraktı(ppm)	<i>H. pylori</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
1000	+	+	+	+	+
500	+	+	+	+	+
250	+	+	+	-	+
125	+	-	+	-	-
62.5	-	-	-	-	-

\_ : Üreme var + : Üreme yok

Biberiye 1000 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında, kullanılan beş patojen (*H. pylori*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii* ve *S. aureus*) üzerinde de inhibitör etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda MİK değeri *S. Typhimurium* için

250 ppm, *S. aureus* ve *C. sakazakii* için 125 ppm, *H. pylori* ve *B. cereus* içinde 125ppm olarak tespit edilmiştir. Yani mikrodilüsyon yönteminde biberiye ekstraktı için en yüksek inhibitör etki, 62.5 ppm ile *H. pylori* ve *B. cereus* üzerinde ölçülmüştür. En düşük inhiye edici etki ise 250 ppm'de üremenin görüldüğü *S. Typhimurium* da olmuştur.

#### 4.2.2. Sarımsak ekstraktının MİK değerleri

Tablo 4.5.'de görüldüğü üzere; seyreltilmemiş ve 1/2 oranındaki sarımsak ekstraktı, çalışılan beş patojen (*H. pylori*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii* ve *S. aureus*) üzerinde de inhibitör etki göstermiştir. En yüksek inhibitör etki 1/8 seyretide de üremenin görülmediği *H. pylori* üzerinde olmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda MİK değerleri; *S. aureus* ve *C. sakazakii* için 1/4, *B. cereus* ve *S. Typhimurium* için 1/8, *H. pylori* içinse 1/16 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.5. Sarımsak ekstraktının 96 kuyucuklu Mikrodilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Oran	<i>H. pylori</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
1	+	+	+	+	+
1/2	+	+	+	+	+
1/4	+	-	+	+	-
1/8	+	-	-	-	-
1/16	-	-	-	-	-

\_ : Üreme var + : Üreme yok

Kim ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada birtakım esansiyel yağlardan elde edilen bileşenlerden citral'in disk difüzyon metodunda küçük inhibisyon zonu oluşturduğunu, sıvı kültür ortamında ise *E. coli* O157:H7 üzerinde yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini, terpineol'ün ise disk difüzyon metodunda büyük inhibisyon zonu oluşturduğunu ancak sıvı kültür ortamında *S. Typhimurium*'u inhiye edebilmesi için yüksek konsantrasyonlara gereksinim duyulduğunu belirtmişlerdir. Bu sebepten dolayı kağıt disk yöntemi ile sıvı kültür metotlarında elde edilen antibakteriyal etkilerin farklılık gösterebildiği bildirilmiştir. Aynı şekilde yaptığımız bu çalışmada da da disk difüzyon metodu ile mikrodilüsyon yöntemindeki sonuçlar arasında bazı farklılıklar oluşmuştur.

Lee ve ark. (2003), biber, brokoli, kırmızı soğan, lahana, yeşil çay, sarımsak, havuç, salatalık gibi değişik sebze sularının bakteriler üzerine engelleyici etkilerini araştırdıkları çalışmada; *Salmonella Epidermidis*, *S. marcescens* *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* 0157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*'e karşı sarımsak ve sulu ekstraktlarının değişik dozlarda en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada da ön deneme aşamasında denenen birçok bitkisel ürün içerisinde en yüksek zonları sarımsak ve biberiye vererek yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermiştir.

#### 4.2.3. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara nisin'in antimikrobiyal etkisi

Nisinin, *H. pylori*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii*'den oluşan beş farklı patojen üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Nisin, *H. pylori*, *S. aureus*, *B. cereus*, üzerinde sarımsak ekstraktına göre daha düşük konsantrasyonlarda etkili olurken *S. Typhimurium* ve *C. sakazakii*'ye etki göstermemiştir. Biberiye ekstraktıyla kıyaslandığında ise nisin, tüm patojenler üzerinde biberiyeden daha etkili olmuştur. Genel olarak Gr (+) bakterilere etkili olmakla birlikte, nisinin Gr (-) bakteriler üzerine de aktivite gösterdiğinin tespit edildiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Noonpakdee ve ark., 2003).

Tablo 4.6. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalara Karşı Nisin'in Antimikrobiyal Etkisi

Nisin(ppm)	<i>H. pylori</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. sakazakii</i>
200	+	+	+	-	-
100	+	+	+	-	-
50	+	+	+	-	-
25	+	+	+	-	-
12.5	+	-	+	-	-
6.25	-	-	-	-	-

\_: Üreme var + : Üreme yok

#### 4.2.4. Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK)

MİK; antibakteriyel maddenin patojenin gelişmesine engel olan en düşük yoğunluğudur. MİK değeri, antimikrobiyel maddenin statik etkisini gösterir. Sarımsak ekstraktı ve biberiye ekstraktının *H. pylori* *S. aureus* *B. cereus* *S. Typhimurium* *E.*



*sakazakii* için 96 kuyucuklu mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri Tablo 4.7.'de verilmiştir. Çalışılan bakteriler içerisinde sarımsak ekstraktına en hassas bakteri MİK değeri 1/16 olan *H. pylori* olurken, biberiye ekstraktına en hassas bakteriler 62.5 MİK değeriyle *H. pylori* ve *B. cereus* olmuştur.

Tablo 4.7. Mikrodilüsyon Yönteminde Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Patojenler	Sarımsak	Biberiye(ppm)
<i>H. pylori</i>	1/16	62.5
<i>S. aureus</i>	1/4	125
<i>B. cereus</i>	1/8	62.5
<i>S. Typhimurium</i>	1/8	250
<i>C. sakazakii</i>	1/4	125

Kumar ve Gupta (1984) tüp dilüsyon metodunu kullanarak yaptıkları çalışmada sarımsak ekstraktının enterotoksin üreten *S.aureus*'un 7 suşuna karşı bakterisidal ve bakteriyostatik olduğunu bildirmişlerdir. Minimum bakterisidal (letal) konsantrasyon (MBK) 1/8; minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) 1/16 olarak belirlenmiştir. Sarımsak ekstraktının aynı zamanda enterotoksin üretimini 1/32 konsantrasyonda inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Tüp dilüsyon metodu kullanarak yapılan başka bir çalışmada ise sarımsak ekstraktının *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MİK değerinin 1/32, MBK değerinin 1/16 olduğu bulunmuştur. Sonuçlardaki farklılığın söz konusu çalışmada *S. aureus*'un 7 suşunun klinik izolat olması, diğer çalışmada kullanılan *S. aureus*'un ise standart bir suş olmasından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır.

Lee ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, tüp dilüsyon metodunu kullanarak; MİK ve MBK değerlerini belirlemek için, içlerinde sarımsağın da olduğu birçok bitki özütünü çeşitli bakterilere karşı denemişlerdir. Bu bitkilerden sarımsak ve yeşil Japon çayı (*Camellia sinensis*)'nın en yüksek antibakteriyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırma sonuçlarında *S. aureus* ATCC 29213 için minimum inhibitör dilüsyon (MİD) değerini 1/256, minimum bakterisidal dilüsyon (MBD) değerini ise 1/64 olarak bildirmişlerdir. Yine *E. coli* 0 157 H7 için MİD değerini 1/128, MBD değerini ise 1/64 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızdaki sonuçlardaki farklılığın nedeninin; bakteri suşlarının farklı oluşundan, ekstraksiyon metodunun farklılığından, kullanılan sarımsağın sahip olduğu lokal özelliklerinden kaynaklandığı düşünülebilir.

### 4.3. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin Sarımsak Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada sarımsak ekstraktının disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkisi belirlenmiş ve mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri saptanmıştır. Daha sonra ortamın yağ içeriğinin ve sarımsak ekstraktının gıda kaynaklı patojenlere (*H. pylori*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii*) karşı antimikrobiyal etkisinde herhangi bir değişime neden olup olmadığı araştırılmıştır. Gerekli emulsiyonu oluşturması için Tween 20 kullanılmıştır.

#### 4.3.1. *Helicobacter pylori*

*H. pylori* sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.8.'de verilmiştir. Tween 20 varlığında ortama eklenen %10 yağ düzeyinde, sarımsak ekstraktları bakteri gelişiminde önemli bir farklılık göstermezken %20 yağ düzeyinde %95 güven aralığında fark önemli bulunmuştur.

Tablo 4.8. Tween 20 Varlığında Sarımsak ve Farklı Yağ Oranlarında *H. pylori* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	12	7,43 <sup>A</sup>	0,046
10	12	7,42 <sup>A</sup>	0,022
20	12	7,29 <sup>B</sup>	0,043

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P < 0,05$ )

N: Yağ oranları x sarımsak konsantrasyonları

%20 yağ düzeyinde elde edilen *H. pylori* sayısının %10 yağ düzeyine göre daha az olduğu belirlenmiştir. %20 yağ içeren ortamın %10 yağ içeren ortama göre inhibitör etkisinin daha belirgin olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* sayıları istatistiksel deneme metodu kullanılarak değerlendirilmiş, Tween 20 ve sarımsak ekstraktı varlığında yağ konsantrasyonlarının bakteri gelişimi üzerinde etkisinin önemli düzeyde ( $p < 0,05$ ) olmadığı görülmüş ve sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Tween 20 Varlığında Sarımsak ve Farklı Yağ Oranlarında *S. aureus* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	12	7,81 <sup>A</sup>	0,002
10	12	7,79 <sup>A</sup>	0,041
20	12	7,73 <sup>A</sup>	0,030

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P < 0,05$ )

N: Yağ oranları x sarımsak konsantrasyonları

*S. aureus*, Tween 20 varlığında çalışılan sarımsak ve yağ oranlarında (%0, %10, %20) inaktive edilememiştir. Tablo 4.9’da da görüldüğü gibi %95 güven aralığında bakteri gelişimi sarımsak ekstraktından ve yağ oranlarından istatistiksel olarak etkilenmemiştir ( $p > 0,05$ ). Benzer bir sonuç Elvan (2003)’ün çalışmasında *Bacillus cereus* ve *E. coli* O157:H7 bakterileri için elde edilmiştir. Greylfurt çekirdeğinin çeşitli konsantrasyonlarında yağ içeriğinin bakteriyel gelişim üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir.

#### 4.3.3. *Bacillus cereus*

Tablo 4.10.’da verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere, kontrol ortamına eklenen yağ düzeyinin mikrobiyal gelişimi teşvik ettiği ancak %10 ve %20 yağ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

Tablo 4.10. Tween 20 Varlığında Sarımsak ve Farklı Yağ Oranlarında *B. cereus* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	15	7,88 <sup>B</sup>	0,043
10	15	7,90 <sup>A</sup>	0,055
20	15	7,91 <sup>A</sup>	0,065

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P < 0,05$ )

N: Yağ oranları x sarımsak konsantrasyonları

Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, farklı yağ oranlarının *B. cereus* gelişimini kontrol örneğine göre arttırdığı görülmüştür ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4. *Salmonella Typhimurium*

*S. Typhimurium* sayımlarına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.11’de görülmektedir. Tween 20 ve sarımsak varlığında kontrol ortamına eklenen %10 yağ oranında *S. Typhimurium* bakterisi gelişiminde istatistiksel olarak önemli bir farklılık

bulunmazken, %20 yağ oranında önemli derecede bir farklılık tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). %20 yağ oranında *S. Typhimurium* sayısında azalma gözlenmiş ve bu azalmanın önemli olduğu görülmüştür.

Tablo 4.11. Tween 20 Varlığında Sarımsak ve Farklı Yağ Oranlarında *S. Typhimurium* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	15	8,14 <sup>A</sup>	0,054
10	15	8,09 <sup>A</sup>	0,070
20	15	7,95 <sup>B</sup>	0,087

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )

N: Yağ oranları x sarımsak konsantrasyonları

#### 4.3.5. *Cronobacter sakazakii*

Tween 20 varlığında kontrol ortamına eklenen %10 ve %20 yağ düzeyinde bakteri gelişimi %10 yağ oranında önemli bir farklılık göstermezken %20 yağ düzeyinde %95 güven aralığında önemli farklılık göstermiştir. %20 yağ oranında *C. sakazakii* sayım sonuçlarında azalma gözlenmiştir. Tween 20 ve sarımsak varlığında gelişme gösteren *C. sakazakii* sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Tween 20 Varlığında Sarımsak ve Farklı Yağ Oranlarında *C. sakazakii* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	15	7,81 <sup>A</sup>	0,149
10	15	7,85 <sup>A</sup>	0,154
20	15	7,67 <sup>B</sup>	0,157

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )

N: Yağ oranları x sarımsak konsantrasyonları

#### 4.4. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin Biberiye Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

96 kuyucuklu mikrodilüsyon yöntemi ile ortamın yağ içeriğinin ve biberiye ekstraktının çalışılan test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisinde herhangi bir değişime neden olup olmadığı araştırılmıştır. Gerekli emulsyonu oluşturması için Tween 20 kullanılmıştır.

#### 4.4.1. *Helicobacter pylori*

Tween 20 ve sarımsak varlığında *H. pylori* sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Tablo 4.13’de görüldüğü üzere yağ konsantrasyonlarının bakteri gelişimi üzerinde etkisinin önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) olduğu belirlenmiştir. %0, %10 ve %20 yağ konsantrasyonları arasında %95 güven aralığında bakteri gelişimi düzeyindeki düşüşün önemli olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.13. Tween 20 Varlığında Biberiye ve Farklı Yağ Oranlarında *H. pylori* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	12	7,86 <sup>A</sup>	0,147
10	12	7,76 <sup>B</sup>	0,113
20	12	7,67 <sup>C</sup>	0,109

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )

N: Yağ oranları x biberiye konsantrasyonları

%10 ve %20 yağ oranında elde edilen *H. pylori* bakteri sayıları incelendiğinde yağ oranı arttıkça bakteri gelişimindeki azalışın istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Yapılan bir çalışmada da farklı yağ düzeylerine sahip oluşturulan model sistemde düşük Greyfurt çekirdeği ekstraktı konsantrasyonlarında yağ içeriğinin antimikrobiyal etkinliğini azalttığı belirlenmiştir (Şahin, 2006).

#### 4.4.2. *Staphylococcus aureus*

Tablo 4.14’de Tween 20 ve biberiye varlığında gelişme gösteren *S. aureus* sayım sonuçları verilmektedir. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde %95 güven aralığında mikrobiyal gelişimin biberiye ve yağ oranlarından (%0, %10 ve %20) etkilendiği gözlenmiştir.

Tablo 4.14. Tween 20 Varlığında Biberiye ve Farklı Yağ Oranlarında *S. aureus* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	12	8,36 <sup>B</sup>	0,103
10	12	8,44 <sup>A</sup>	0,086
20	12	8,24 <sup>C</sup>	0,092

A, B, C aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )

N: Yağ oranları x biberiye konsantrasyonları

Tween 20 ve biberiye varlığında kontrol ortamına göre %10 yağ ortamı *S. aureus* gelişimini artırırken, %20 yağ ortamı azaltıcı yönde etki etmiştir ve bu değişimin istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

#### 4.4.3. *Bacillus cereus*

*B. cereus* sayımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tablo 4.15.'de görüldüğü üzere yağ konsantrasyonlarının bakteri gelişimi üzerinde etkisinin sadece %20 konsantrasyonda önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) olduğu belirlenmiştir. Kontrol ortamına eklenen % 10 ve %20 yağ düzeyindeki besi ortamında bakteri gelişimi üzerinde sadece %20 yağ düzeyi, %95 güven aralığında önemli farklılık göstermiştir.

Tablo 4.15. Tween 20 Varlığında Biberiye ve Farklı Yağ Oranlarında *B. cereus* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	12	7,53 <sup>B</sup>	0,075
10	12	7,55 <sup>B</sup>	0,071
20	12	7,60 <sup>A</sup>	0,082

A, B aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )  
N: Yağ oranları x biberiye konsantrasyonları

#### 4.4.4. *Salmonella Typhimurium*

Tablo 4.16.'da biberiye ve Tween 20 varlığında gelişme gösteren *S. Typhimurium* sayım sonuçları verilmektedir. Kontrol ortamına eklenen %10 yağ düzeyinde ki besi ortamında bakteri gelişimi üzerinde önemli bir farklılık göstermiş olup %95 güven aralığında fark önemli çıkmıştır.

Tablo 4.16. Tween 20 Varlığında Biberiye ve Farklı Yağ Oranlarında *S. Typhimurium* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	15	7,10 <sup>B</sup>	0,053
10	15	7,14 <sup>A</sup>	0,013
20	15	7,07 <sup>C</sup>	0,040

A,B, C aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )  
N: Yağ oranları x biberiye konsantrasyonları

Tablo 4.16.'da görüldüğü üzere kontrol ortamına göre %10 yağ ortamı *S. Typhimurium* gelişimini artırırken, %20 yağ ortamı azaltıcı yönde etki etmiştir ve bu değişimin istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

#### 4.4.5. *Cronobacter sakazakii*

*C. sakazakii* sayımları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.17 verilmiştir. Tablo 4.17.'de görüldüğü üzere yağ konsantrasyonlarının (%0, %10 ve %20) bakteri gelişimindeki etkisinin önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) olduğu görülmüştür. Tween 20 ve biberiye varlığında kontrol ortamına göre %10 ve %20 yağ ortamı *C. sakazaki* gelişimine azaltıcı yönde etki etmiş ve bu değişimin istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

Tablo 4.17. Tween 20 Varlığında Biberiye ve Farklı Yağ Oranlarında *C. sakazaki* Sayıları ( $\log_{10}$  kob/ml)

Yağ oranı (%)	N	Bakteri Sayısı Ortalaması	Standart Hata
0	15	8,82 <sup>A</sup>	0,039
10	15	7,91 <sup>B</sup>	0,062
20	15	7,70 <sup>C</sup>	0,041

A, B, C aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )  
N: Yağ oranları x biberiye konsantrasyonları

#### 4.5. Tween 20'nin Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

Yağ içeren sıvı kültür ortamlarına emülsifiyer madde olarak Tween 20 (polyoxiethylene (2) sorbitan monolaurate)'nin eklendiği durumlarda Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada antibakteriyel etkisi araştırılan biberiye ekstraktına karşı en dirençli olan *S. Typhimurium* ve sarımsak ekstraktına karşı en edirençli olan *S. aureus bakterileri* seçilerek Tween 20 ilave edilmeden ve %1,5 Tween 20 varlığında ekstraktların etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.18. ve 4.19.'da verilmektedir.

Tablo 4.18. Emülgatör Olarak Tween 20'nin Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Sarımsak Ekstraktlı Besiyerinde *S. aureus* Gelişimi (kob/ml)

Tween 20 (%)	Yağ(%)	<i>S. aureus</i> (kob/ml)
0	0	8.41 <sup>A</sup>
0	20	8.79 <sup>B</sup>
1.5	0	6.53 <sup>C</sup>
1.5	20	7.19 <sup>D</sup>

A, B, C; Aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).

Tween 20 varlığında, yağ içermeyen besiyerinde; 1/8 sarımsak ekstraktı, mikrobiyal populasyon üzerinde önemli derecede azalma göstermiştir. Emülgatör olarak Tween 20 kullanılmadığında ise sarımsak ekstraktı daha az antimikrobiyal etki göstermiştir. Her iki azalma da istatistiksel olarak önemli çıkmıştır (P<0.05).

Tablo 4.19. Emülgatör Olarak Tween 20'nin Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Biberiye Ekstraktlı Besiyerinde *S. Typhimurium* Gelişimi (kob/ml)

Tween 20 (%)	Yağ (%)	<i>S. Typhimurium</i> (kob/ml)
0	0	7.35 <sup>A</sup>
0	20	7.40 <sup>B</sup>
1.5	0	7.29 <sup>C</sup>
1.5	20	7.46 <sup>D</sup>

A, B, C; Aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).

Emülgatör olarak Tween 20'nin yağ içermeyen besiyerine eklendiği durumda 125 ppm biberiye ekstraktı, mikrobiyal populasyonu azaltıcı etki göstermiştir ve bu etki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Tween 20, %20 yağ içeren ortamda kullanıldığında ise mikroorganizma popülasyonunda artış tespit edilmiştir. Bu artışın yağın koruyucu etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir. Tween 20 kullanılmadığında ise; % 20 yağ içeren ortamda biberiye ekstraktı daha az etki göstermiştir.

Emülsifiyer olarak en çok kullanılan maddeler; Tween 20, Tween 80 (polysorbate 80), DMSO (dimethylsulfoxide) ve etanol ve metanoldur. Fakat bu maddeler test sisteminin fizikokimyasal özelliklerinde farklılığa sebep olduğundan dolayı inhibitör etkide artma ya da azalmaya sebep olabilmektedir. Tween 20, Tween 80 gibi iyonik özellik göstermeyen sörfektanların oluşturduğu misellerin içinde lipofilik moleküller



tutulmakta, süspansiyon içerisinde kısmi bir şekilde dağılmaktadır. Miseller içinde tutulan inhibitör madde mikroorganizmalar üzerinde etki göstermemekte ve inhibisyonu gerçekleştirememektedir. Emülsifiye edici maddenin yoğunluğu arttıkça daha fazla etki gösterebilmektedir (Mann ve ark., 1998).

Yapılan bir çalışmada kağıt disk yöntemi ile *E. coli*, *E. coli* 0157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *V. vulnificus* üzerinde 11 esansiyel yağ bileşeninin antimikrobiyal etkisini araştırmak için kontrole % 2 Tween 20 çözeltisi eklenmiştir. Tween 20, suyu sevmeyen (hidrofobik) bileşenlerin çözünürlüğünü arttırmak ve bakteriyel hücre zarına geçişine yardımcı olmak için kullanılmıştır. Sonuçta *L. monocytogenes* için 0.7-0.8 cm zon oluşumu belirlenmiş, diğer suşlar için ise zon oluşumu belirlenememiştir (Kim ve ark., 2004).

Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada Greyfurt çekirdeği ekstraktı ve Tween 20 için antagonistik etki belirlenmiş, emülgatör olarak Tween 20 kullanılmadığında 600 ppm Greyfurt çekirdeği ekstraktında mikrobiyal popülasyonun tamamen yok edildiği belirtilmiştir (Şahin, 2006).

Juven ve ark. (1994), bu çalışmalardan farklı olarak ortamda Tween 80 konsantrasyonu azaldıkça timol ve kekik yağının, *S. Typhimurium* sayısında azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir.

Jong ve ark. (1999), yapmış olduğu bir çalışmada ise, kullanılan Tween 20 yoğunluğuna bağlı olarak *Lactobacillus amylovorus* IMC-1'in üretmiş olduğu antimikrobiyal maddenin aktivitesinin yükseldiği anlaşılmıştır. Tween 80 ve nisin birlikte kullanıldığı şartlarda ise sütte *L. monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkinin arttığı belirlenmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada da; genel olarak %20 yağ ve %1.5 Tween 20 kullanıldığında, bakteri sayılarında artış, dolayısıyla sarımsak ve biberiyenin etkisinde azalma göstererek Jong ve ark. (1999) ve Elvan (2006) ile benzer sonuç vermiştir.

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada kağıt disk difüzyon ve 96 kuyucuklu mikrodilüsyon metodları kullanılarak biberiye ekstraktı ve sarımsak ekstraktının *H. pylori*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii* üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Ortamın yağ ve Tween 20 içeriğinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla da, kültür ortamına yağ ve Tween 20 ilave edilmiş ve mikrobiyal gelişim izlenmiştir. Ayrıca nisin bakteriyosini ile Cephalexin 30 (Cl 30) ve Tetracycline 30 (Te 30) antibiyotiklerinin de çalışılan bakteriler üzerine antimikrobiyal etkileri tespit edilmiştir.

Kağıt disk difüzyon metodu ile biberiye ve sarımsak ekstraktının oluşturdukları inhibisyon zonları değerlendirildiğinde; söz konusu ekstraktı tüm bakteri suşlarında zon oluşturmuş olup; en yüksek zon değerini 30,13 mm ile sarımsak ekstraktı *S. aureus* üzerinde oluşturmuştur. Bu değer Cl 30 ve Te 30 antibiyotiklerinde sırasıyla 19.40mm ve 25 mm olarak ölçülmüştür. Sarımsağın 24.50 mm ile en etkili olduğu ikinci bakteri olan *B. cereus*, bu antibiyotiklere sırasıyla 17.00 mm ve 19.70 mm ile daha çok direnç göstermiştir.

1/1 ve 1/8 oranındaki sarımsak ekstraktı ise en büyük etkiyi sırasıyla 30.1-11.2 mm zon ile *S. aureus* 'a ve *C. sakazakii* 'ye göstermiştir. 1/1 oranında Sarımsak ekstraktının bakterilerde etki sıralaması; *S. aureus* > *B. cereus* > *C. sakazakii* > *S. Typhimurium* > *H. pylori* şeklinde olurken, Biberiye ekstraktında ise bu sıralama *B. cereus* > *S. aureus* > *H. pylori* > *C. sakazakii* > *S. Typhimurium* şeklinde olmuştur. 1000 ppm biberiye ekstraktına en duyarlı bakteri 21 mm zon çapıyla *B. cereus* olurken, Cl 30 ve Te 30 antibiyotiklerinin bu bakteriye etkisi daha az olmuştur.

Çalışmada mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan analizlerde; 1000 ppm-500 ppm konsantrasyonda biberiye ekstraktı tüm patojenler üzerinde inhibe edici etki gösterirken, en yüksek inhibitör etki 62.5 ppm MİK değeri ile *H. pylori* ve *B. cereus* üzerinde olmuştur. En düşük inhibitör etki ise 1000 ppm ve 500 ppm de üremenin görülmediği *Salmonella Typhimurium*'da olmuştur. Antimikrobiyal etkisi araştırılan sarımsak ekstraktında ise 1/1 ve 1/2 oranlarında tüm patojenler üzerinde inhibe edici etki görülürken, en yüksek inhibitör etki 1/8 oranına kadar üremenin görülmediği *H. pylori* üzerinde olmuştur. 1/8 oranındaki sarımsak ekstraktında en düşük MİK değeri ise; *H. pylori* 'de saptanmıştır. Biberiye ekstraktında ise en düşük MİK değeri 62.5 ppm ile *H. pylori* ve *B. cereus* da belirlenmiştir. Nisin'in bu bakteriler için MİK değeri 6.25 ppm ile söz konusu ekstraktlardan daha düşük olmuştur.

Tween 20 varlığında yağ düzeylerinin antimikrobiyal etkileri de incelenmiştir. Sarımsak ekstraktı; %20 yağ düzeyinde, *H. pylori*, *S. Typhimurium*, *C. sakazakii* ve *B. cereus* üzerindeki etki göstermiş olup; *S. aureus* üzerinde farklı yağ oranlarının etkisi tespit edilmemiştir ( $P<0.05$ ). Biberiye ekstraktında ise; %0, %10 ve %20 yağ düzeylerinin üçünde de *S. Typhimurium* hariç diğer bakteriler için önemli düzeyde etki görülmüştür ( $P<0.05$ ).

Çalışmada antibakteriyal etkisi araştırılan biberiye ekstraktına karşı en dirençli olan *S. Typhimurium* ve sarımsak ekstraktına karşı en dirençli olan *S. aureus* bakterileri seçilerek; Tween 20 kullanılmadan ve %1,5 Tween 20 varlığında ekstraktların etkisi incelenmiştir. Tween 20, biberiye ekstraktı ve sarımsak ekstraktının inhibitör etkisini azaltmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tween 20'nin inhibitör etkisi önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Doğal antimikrobiyaller son yıllarda hem bilim dünyası hem de gıda teknolojisinin odağı durumundadır. Yapılan çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmekle birlikte, bu çalışmaların uygulanabilirlik kazanması önemlidir. Tüketici açısından kabul edilebilir, ekonomik açıdan sürdürülebilir ve gıdanın duysal profiline uygun etkili doğal antimikrobiyallerin kullanımının artması, kimyasal koruyucu ve antibiyotiklerin gıda maddelerinden kullanımının azaltılmasında önemli rol oynayacaktır.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; kullanılan biberiye ve sarımsak baharatlarının gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibitör etkiye sahip oldukları anlaşılmıştır. Ancak çalışmada kullanılan baharatların yüksek konsantrasyonda daha fazla etki göstermesi sebebiyle, laboratuvar şartlarının yanı sıra yüksek konsantrasyonların gıdalarda tat ve koku üzerinde olumsuz etki gösterme ihtimalinden dolayı bu sonuçlara göre araştırmada kullanılan baharatların çeşitli gıdalar üzerinde çalışılması gerekli ve faydalı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Acartürk, R. 1993. Şifalı Bitkiler Flora ve Sağlığımız. Orman Genel Müdürlüğü Mensupları Yardımlaşma Vakfı. Ovak Yayınları No. 1. 90 s. Ankara.
- Ahmad, J. I. 1996. Garlic-a Panacea for Health and Good Taste. Nutrition and Food Science (1), 32-35.
- Ahn, J., Ingolf, U. Grün., A.Mustapha .2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef Food Microbiology (1)-24: 7-14.
- Altındış, M., Özdemir, M., 2003. Helicobacter Pylori ve Tanısı. Kocatepe Tıp Dergisi(2), 1-12.
- Ali, M., Thomson, M., Afzal, M. 2000. Garlic and onions: their effect of eicosanoid metabolism and its clinical relevance. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 62 (2) : 55-73.
- Anesini, C. and Perez, C. 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacy. 39: 119-128.
- Ankri, S. and Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection. 2: 125-129.
- Arora, D. S. and Kaur, J. 1999. Antimicrobial activity of spices. Int. J. Antimicrob. Agents. 12 (3) : 257-262.
- Arauz, L.C., A. F., Jozala, P.G., Mazzola. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review TCV Penna Trends. Food Science & Technology 20 (3-4), 146-154.
- Azzous, M. A. and Bullerman, L. B. 1982. Comparative Antimycotic Effects of Selected Herbs, Spices, Plant Components and Commercial Antifungal Agents. Journal of Food Protection. 45 (14) : 1298-1301.
- Ayhan, K. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamalar. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü Yayını, 1- 522.

- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.S., Shao, X., Pan, M.H. 2010. Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5363– 5367.
- Bagamboula, C.F. Uyttendaele, M. and Debevere, J. 2003. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection*, 66 (4) : 668-673.
- Baltacıoğlu, E., Akalın, A., Tetrasiklinler ve Anti-Kollogenaz özellikleri, Periodontal Tedavide Kullanımlarına Yeni Bir Yaklaşım. *Haccettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* (1), 97-107.
- Bauer, A.U., Kirby, W.M., Sherris, J.C, Tack, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *J Clin Pathol*, 45, 493-494.
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M. and Joosten, H.M. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 967-973.
- Bozin, B. Mimica-Dukic, N. Samojlik, I. Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural*. 55(19):7879-85.
- Burt, S. 2003. Antibacterial Activity of Selected Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 162-167.
- Del Campo, P.J., Amiot, M.-J., Nguyen-The, C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*. 63: 1359-1368.
- Ceylan, A. 1997. *Tıbbi Bitkiler 2 (Uçucu Yağ Bitkileri)* Ege Üniv. Ziraat Fak. Yay, İzmir.
- Chenu, J.W., Cox, J.M. 2009. *Coxsacronobacter* ('*Enterobacter sakazakii*'): current status and future prospects. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254.
- Collins, M.A., H.P., Charles. 2005. Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Meat Science* (69), 3: 371-380.
- Çalıcıoğlu, M. 2014. Gıda hijyeni ve kontrolü ders notları; Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ.
- Christine L. Hartley, Helen M. Clements, K. B. Linton. 1978. Effects of cephalixin, erythromycin and clindamycin on the aerobic gram-negative faecal flora in man (Plate VII) *Journal of Medical Microbiology* 11: 125-135.

- Çelikleş, Y. Ö. Girgin, G., Orhan, H., Wichers, H. J. Bedir, E. Vardar-Sukan, F. 2007a. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *European Food Research and Technology*. 224: 443–451.
- Çelikleş, Y., Ö., Hameş Kocabaş, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Özek, T., Başer, K.H.C. 2007b. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 100: 553-559.
- Davidson, P. M. and Naidu, E.S. 2000. *Phyto-Antimicrobials in Natural Food Antimicrobial Systems*, A.S. CRC Press, 1-818.
- Davidson, P. M., Naidu, A.S. 2003. Phyto-Phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2958–63.
- Davidson, P. M., Naidu, A.S. 1989. Phyto-phenols. *Food technology* 43, 148-155, 1989.
- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente- García, O. Del Río, J.A. Ortuño, A. Quirin, K.W. Gerard, D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4247–4253.
- Djamel Djenane Armida Sánchez-Escalante<sup>1</sup> José A Beltrán Pedro Roncalés. 1987. Ability of tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere, *Food Microbiology* (4),4: 311-315.
- Duman A. B. 2008. Bazı tıbbi bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. *Kafkas Üniv. Veteriner Fak. Dergisi* 14 (1): 83-87, 2008.
- Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A. and Mount, J.R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.*, 64(7); 1019-1024.
- Elnima, E. I. Ahmed, S.A., Mekkawi, A. G., Mossa, J. S. 1983. The Antimicrobial Activity of Garlic and Onion Extracts. *Pharmazie*. 38 (H 11) : 747-748.
- Elsom, G. K., D. H. Ve D. M. Salmon. 2000. An Antibacterial Assay of Aqueous Extract of Garlic against Anaerobic/Microaerophilic and Aerobic Bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12, 81-84.
- Erik, S., Tarıkahya B. 2004. Türkiye Florası Üzerine. *Kebikeç İnsan Kaynakları Araştırmaları Dergisi* (17), 139-163.

- Erdoğan, E. A., Everest, A. 2013. Antimicrobial activities of aqueous extracts and essential oils of two endemic species from Turkey. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 12 (2): 221-224.
- Erkmen, O. 2010 *Gıda Mikrobiyolojisi*. Efil Yayınevi, 1-541.
- Ernst P. B., Gold B. D. 2000. The disease specturum of *Helicobacter pylori*: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*; 54: 615-40.
- Erol, İ. 2007. *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara.
- Evren, M., Apan, M., Albayram, C. 2006. Sarımsağın Antimikrobiyel Özellikleri. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*; 24-26 Mayıs, Bolu.
- Fernández, J., López, N., Aleson, Z. L., Carbonell, J. A., Pérez Alvarez, V. Kuri. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs *Meat Sci.* 69(3):371-80.
- Friedman, M., Buick, R., Eliot, C.T., 2004. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores. *Escherichia coli* and *Stephylococusaureus*. *T. Food. Prot.*, 67: 1774-1778.
- Forman D., Newell D. G., Fullerton F., Yarnell J. W., Stacey A. R., Wald N. and F Sitas. 1991. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br. Med. J.*; 302:1302–1305.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. 2007. Chemical and biological characteristics of *cuminum cyminum* and *rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 55:7879-7885.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International* 33, 83–90.
- Gönül, Ö., 2017. Kremaların Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Nisin ve Lizozimin Etkisi. *İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi, Anabilim Dalı, Doktora Tezi*.
- Granum, P. E. 1997. Eds. Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. *Bacillus cereus*, in *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 327-336 ASM Press, Washington DC.
- Gurbuz B., Bagdat R. B., Uyanik M. and Rezaeieh K. A. P., 2016. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivation studies under Ankara ecological conditions. *Industrial Crops and Products*, (88), 12–16.



- Gülbaba A.G., Özkurt N, Kürkçüoğlu M, Başer K. H. C., 2002. Mersin ve Adana yöresindeki doğal biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) popülasyonlarının tespiti ve uçucu yağ verim ve bileşenlerinin belirlenmesi. Orman Bakanlığı Yayın No:193.
- Hao, Y.Y., Brackett R.E., and Doyle, M.P. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *J.Food. Prot.* 61:307-312.
- Hazır, S. 2004. The Antimicrobial Effect of Garlic (*Allium sativum* L.). *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry.* 33: 93-100.
- Harris, J. C., S. L. Cotrell, S. Plummer ve Lloyd, D. 2001. Antimicrobial Properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiological Biotechnology* 57, 282-286.
- Hughes, B.G. and Lawson, L. D. 1991. Antimicrobial Effects of *Allium sativum* L. (Garlic), *Allium ampeloprasum* L. (elephant garlic), and *Allium cepa* L. (Onion), Garlic Compounds and Commercial Garlic Supplement Products. *Phytotherapy Research.* 5:154-158.
- Hussain A. I., Anwar F., Chatha S. A. S., Jabar A., Mahboob S., Nigam P. S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1070-1078.
- Iversen, C., Forsythe, S., 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.* 14: 443-454.
- Iversen, C. M. Lane and S., Forsythe. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:378-382.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1442–1447.
- İzğür, M., Akan, M. 2002. Kanatlılarda *Salmonella* enfeksiyonları. Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Jong-Soo., M., Miyamoto, T., Kataoka, K., Araki, M., Yoneya, T. and Sewaki, T. 1999. Antibacterial action of an antimicrobial substance from *Lactobacillus*

*amylovorus* IMC-1 against foodborne spoilage and pathogenic organisms. Milk Science (48),2.

- Karim, Q.N., Maxwell, R.H. 1989. Survival of *Campylobacter pylori* in artificially contaminated milk. Journal of clinical pathology, 42, 778.
- Kim S.Y., Kang D.H., Kim J.K., Ha Y.G., Hwang J.Y., Kim T., ve Lee S.E., 2011. Antimicrobial Activity of Plant Extracts Against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. Journal of Food Science, 76 (1): 41-46.
- Kim, J. Marshall, M.R. and Wei, Ç. 1995. Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components Against Five Foodborne Pathogens. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 43:2839-2845.
- Kumar, A. and Gupta, R. S. 1984. A Note On The Sensitivity of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* for Garlic Extract ( *Allium sativum* Linn). Indian Vet. J.61: 718-719.
- Lambert, R. J. W. and Pearson, J. 2000. Susceptibility testing, accurate and reproducible minimum inhibitory concentration MIC. Journal of applied microbiology, 88(5):784-90.
- Laura, L. Zakai,. 1988. Presented as an invited paper, at the Symposium on Spices and Herbs, Division of Agricultural and Food Chemistry 191st American Chemical Society National Meeting, April 13–18, 1986. New York.
- Liu, H.F., Booren, A.M., Gray, J.I. And Crackel, R.L. 1992. Antioxidant Efficacy Of Oleoresin Rosemary And Sodium Tripolyphosphate In Restructured Pork Steaks. Journal of Food Science, 57 (4); 803 – 806.
- Lopez-Malo,A., Alzamora, SM., Salvatori, D., Tapia, MS., Welti-Chanes, J. 2005. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. Journal of Food Engineering 67 (1-2), 205-214.
- Mann, C.M. and Markham, J.L., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Applied Microbiology, 84, 538-544.
- Mau, J., Chen, C. and Hsieh, P., 2001. Antimicrobial effect of extracts from chinese chieve, cinnamon, and corni fructus. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 183-188.
- Meyer, A.S. Nielsen, S.P. Lyngby and Holm, F. 2002. Natural Food Preservatives in Minimal Processing Technologies in the Food Industry. International Journal of Food Microbiology (34), 2, 103-113.

- Naczka, M. Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 (1-2): 95-111.
- Nasar-Abbas, S.M. Halkman, A.K. 2004. Inhibition of Some Foodborne Bacteria by Alcohol Extract of Sumac (*Rhus Coriaria* L.). *Journal of Food Safety*, 24 (2) :257.
- Nazarowec-White, M., Farber, J. M. 2007. *Enterobacter sakazakii*: a review. *International Journal of Food Microbiology* (34), 2, 103-113.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S., 2003. Isolation of Nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 Strain from *Nham*, Traditional Thai Fermented Sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 137-145.
- Nychas, G. J. E. and Skandamis, P. N. 2003. Antimicrobials from herbs and spices in Natural Antimicrobials for Minimal Processing of Foods. Woodhead Publishing p.176-200.
- Özcan, M., ve Erkmen, O. 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology* 212(6):658-660.
- Perumalla A.V.S., Hettiarachchy N.S. 2011. Green Tea and Grape Seed Extracts- Potential Applications in Food Safety and Quality. *Food Research International*, 44: 827-839.
- Pintore, G.U., M., Bradesi, P., Juliano., C., Boatto., G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J. 2002 Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. 17, 15-19.
- Polat, G. Halkman., A. K. 2008 Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 2008.
- Poms, R. E., Tatini, S. R. 2001. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*. (63) 281–286.
- Radin, N.S., 1966. Techniques for improved performance of a rotary vacuum evaporator. *Chemist-Analyst*, 55, 117–118.
- Ravichandran, V., Tiah, Z.X., Subashini, G., Terence, F.W.X., Eddy, F.C.Y., Nelson, J., Sokkalingam, A.D. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities, *J. Saudi Chem. Soc.* ,15: 113-120.

- Robards K., P.D. Prenzler, G., Tucker, P. Swatsitang and W. Glover. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401-436.
- Rode, H., De Wet, P. M., Cywes, S. 1989. The antimicrobial effect of *Allium sativum* L. (garlic). *South African Journal of Science.* 85 : 462-464.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J. and Reglero, G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food. Prot.*, 68(4);790-795.
- Seydim, AC. G. Sarikus. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils - *Food research international*, (39),5 639-644.
- Schelz, Z. Molnar, J., Hohmann, J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* 77 (4) 279-285.
- Skladal, P., Mascini, M., Salvadori, C., Zannoni, G. 1993. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. *Enzyme Microb. Tech.*,15, 508-512.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology.*18:463-470.
- Şahin, F., Karaman, İ., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M. Adıgüzel, A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology* (85), 2-3, 231-235
- Şahin, E., 2006. Bitkisel Kaynaklı Antimikrobiyallerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkileri. İ.T.Ü, F.B.E, Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Sağdıç, O. and Özcan, M., 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, (14), 141-143.
- Şengün, P. Hışıl., Y. 2000. Supercritical-CO<sub>2</sub> extraction of rosemary, Black sea and Central Asian Symposium on Food Technology-Food 2000, Ankara.
- Tassaou C.C, Nycas, J.E and Scandamis, P.N. 2004. Herbs and spices, non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology.* (88):784-790.
- Takikawa, A., Keiko, A., Yamamoto, M., Ishimaru, S., Yasui, M, Okubo, Y. and Yokoigawa, K., 2002. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* 0157. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (4), 315-320.

- Tenover, E. C., Fennel, C. D. 1991. The genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. In "Prokaryotes. Springer-Verlag. 3488-3511.
- Tonbak F, Atasever, M. Çalıcıoğlu, M. 2017. Kanatlı etlerinde *Salmonella* riski. Atatürk Üniv. Vet. Bil. Derg. 12: 90- 98.
- Toroğlu, S., Cenet, M. 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. KSU. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9: 12-20.
- Turp, G.Y. 1999. Tavuk köfterlerinde askorbik, asit,  $\alpha$ -tokoferol/askorbik asit ve biberiye ekstraktı kullanımının bazı kalite özellikleri üzerine etkileri. Ege Üniv. F.B.E, Mühendislik Fak. Gıda Müh. Bölümü. Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Tsao, S. and Yin, M. 2001. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47:665-670.
- Ünlütürk, A. 2003. Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu. In: Ünlütürk, A., Turantaş, F. (Eds), Gıda Mikrobiyolojisi, (3), s,1- 188, İzmir.
- Quaglia, N. C., Dambrosio A, Normanno G., Parisi A., Firinu B., Lorusso V, Celano G. V. 2007. Survival of *Helicobacter pylori* in artificially contaminated ultra high temperature and pasteurized milk. Food Microbiol, 24: 296-300.
- Valero, M., Salmerón., M.C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. Int. J. Food Microbiol. 15;85(1-2):73-81.
- Vale, F.F., Vitor J.M.B. 2010. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas. Int. J. Food Microbiol; (138): 1-12.
- Vandenbergh, P. A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews. 12: 221-237.
- Yalçın, H., Yıldız, H. Nergiz, C. 1997. Baharatların Kimyasal Bileşimi ve Gıda Sanayinde Kullanımı. E. Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi Seri B. Gıda Mühendisliği 15(1-2),219-228.
- Yılmaz,B., Tosun,H. 2012. Sütte Bulunan Doğal Antimikrobiyal Sistemler ve Bunların Gıda Sanayinde Kullanımı. C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi.,8.1(2012) 11-20.
- Yula, E. 2009. Bölgemizden İzole Edilen *Helicobacter Pylori* Suşlarının Moleküler Epidemiyolojik Özelliklerinin Tespiti. Çukurova Üniv. Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,Doktora Tezi.

- Yuste, J. and Fung, D.Y.C. 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. *Journal of Food Protection*, 65 (10) : 1663-1666.
- Zaika L.L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*. 9(2),97–118.
- Zhou, X., Gao, J., Huang, Y., Fu, S., Chen, H. 2011. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula, *African Journal of Microbiology Research*, 5(19): 3073-3077.

## ÖZGEÇMİŞ

Mustafa ASLAN, 24.01.1988 tarihinde Gaziantep'te doğdu. İlköğretim ve liseyi Gaziantep'te tamamladı. 2005 yılında Türkan Ömer Okan Lisesi'nden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2016 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2015-2018 yılları arasında Adapazarı İlçe Tarım Müdürlüğü'nde Gıda kontrol görevlisi olarak çalıştı. 2018 yılında Hatay Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'ne tayin oldu ve halen görevine devam etmektedir.