

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

**ÇAY AĞACI VE PORTAKAL YAĞLARININ
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Leyla DEMİR

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Enstitü Bilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ÖZBEK

HAZİRAN-2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇAY AĞACI VE PORTAKAL YAĞLARININ
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Leyla DEMİR

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

"Bu tez 17.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oy birliği / Oy çokluğu ile kabul edilmiştir."

JÜRİ ÜYESİ	KANAATI	İMZA
Prof. Dr. Mehmet Kırcağaç	Başarılı	
Prof. Dr. Ahmet ÖZBEK	BASARILI	
Dr. Öğr. Üyesi Tugay Nispet GÖK	BASARILI	

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden 25/01/2019 tarihinde onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımı olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



10.07.2019

Leyla DEMİR

TEŞEKKÜR

Tez konumu belirlemede ve devamını sağlamamda bilgi ve fikirleriyle her daim yanımda olan ve desteğini esirgemeyen danıőman hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZBEK'e, tez çalışmam sırasında Albafarma İlaç Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalıőmama izin veren, olanaklar sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Albafarma İlaç Genel Müdür'ü Sn. Fikret DİN'e, fikir ve paylaőımları için yüksek lisans dönem arkadaőlarım ve desteklerini esirgemeyen, Başer Sağlık Meslek Lisesi Müdürü Metin TAŐKIN ve Müdür Yardımcısı Hatice SEYHAN KUTLUAY'a en içten teőekkürlerimi sunarım.

Her koőulda yanımda olan, desteklerini bende hiçbir zaman esirgemeyen eőim Tarık Umut DEMİR, annem Ayőegöl CÜCÜGEN, babam Ceyhun CÜCÜGEN ve kardeőim Ő.Alper CÜCÜGEN'e gönülden minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Leyla DEMİR

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	III
KISALTMA VE SİMGELER.....	V
TABLolar	VII
RESİMLER.....	VIII
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ESANSİYEL YAĞLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	3
2.2.2. Aromatik Özelliklerine Göre	5
2.2.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre.....	5
2.3. ESANSİYEL YAĞLARIN ELDE EDİLME YÖNTEMLERİ.....	5
2.3.1. Damıtma (Destilasyon) Yöntemi	6
2.3.2. Ekstraksiyon Yöntemi.....	6
2.3.3. Mekanik Yöntem (Presleme).....	7
2.4. ESANSİYEL YAĞLARIN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ	7
2.5.1. Çay Ağacı Yağının (TTO) Kimyasal ve Antimikrobiyal Özellikleri	9
2.6. PORTAKAL YAĞI.....	11
2.6.1. Portakal Yağının Kimyasal ve Antimikrobiyal Özellikleri	12
2.7. MİKROORGANİZMALAR	13
2.7.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.7.2. <i>Escherichia coli</i>	15
2.7.3. <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.7.4. <i>Salmonella typhimurium</i>	18
2.7.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.7.6. <i>Candida albicans</i>	21
2.7.7. <i>Aspergillus brasiliensis</i>	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. GEREÇLER	24

3.2. KİMYASALLAR / REAKTİFLER	25
3.3. MİKROORGANİZMALAR	25
3.4. YÖNTEMLER	25
3.4.1. Hazırlık Aşaması.....	25
3.4.1.3. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Hazırlanması	26
3.4.2. Uygulama Aşaması	29
4. BULGULAR	32
4.1. ESANSİYEL YAĞLARIN DİSK DİFÜZYON TESTİ BULGULARI.....	32
4.2. ESANSİYEL YAĞLARIN MİK BULGULARI	34
4.3. ESANSİYEL YAĞLARIN YAYMA PLAK TESTİ BULGULARI.....	37
4.4. KONTROL GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN DİSK DİFÜZYON TESTİ BULGULARI.....	40
ÇÖZÜCÜLERİN DİSK DİFÜZYON TESTİ BULGULARI	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	50
EKLER.....	64
ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMA VE SİMGELER

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
p	: İstatistiksel Anlamlılık Düzeyi
Ort	: Aritmetik ortalama
RSD	: Standart Sapma Değeri
ml	: Mililitre
lt	: Litre
MHB	: Mueller Hinton Broth
MHA	: Mueller Hinton Agar
PDA	:Potato Dextrose Agar
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
EMB	: Eosin Methylen-blue Lactose Agar
MCA	: MacConkey Agar
MCB	: MacConkey Broth
MYA	: Malt Yeast Agar
KIA	:Kligler Iron Agar
G	: Gram
Dk	: Dakika
pH	: Hidrojen Gücü

°C	: Santigrat Derece Sıcaklık
Mm	: Milimetre
ÜG	: Üreme Görüldü
GG	: Gelişme Görülmedi
ATCC	: American Type Culture Collection
TTO	: Tea Tree Oil
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
DMSO	: Aqueous Dimethyl Sulfoxide
LAF Kabini	: Laminar Air Flow Kabini

TABLolar

Tablo 1: Bazı Aromatik Bitkilerin İÇerdikleri Aktif Maddeler ve Etki Şekilleri (Şengezer ve Güngör 2008)	4
Tablo 2: Melaleuca alternifolia uçucu yağının kimyasal içeriği (Intorasoot, Chornchoem, Sookkhee and Intorasoot 2017)	10
Tablo 3: Kontrol Grubu Antibiyotiklerin Hazırlanması.....	29
Tablo 4: Çay Ağacı Esansiyel Yağının Farklı Dilisyonlarının Antibakteriyel Etki Sonuçları	32
Tablo 5: Portakal Esansiyel Yağının Farklı Dilisyonlarının Antibakteriyel Etki Sonuçları	33
Tablo 6: Çay Ağacı ve Portakal Esansiyel Yağı Kombinasyonunun Farklı Dilisyonlarının Antibakteriyel Etki Sonuçları	34
Tablo 7: Çay Ağacı Esansiyel Yağının Test Edilen Bakteriler Üzerinde MİK Sonuçları	35
Tablo 8: Portakal Esansiyel Yağının Test Edilen Bakteriler üzerinde MİK Sonuçları	36
Tablo 9: Çay Ağacı ve Portakal Esansiyel Kombinasyonunun Test Edilen Bakteriler üzerinde MİK Sonuçları.....	37
Tablo 10: Çay Ağacı Esansiyel Yağının Farklı Konsantrasyonlarının C. albicans ve A. brasiliensis üzerinde Antifungal Etkileri.....	38
Tablo 11: Portakal Esansiyel Yağının Farklı Konsantrasyonlarının C. albicans ve A. brasiliensis üzerinde Antifungal Etki Sonuçları.....	39
Tablo 12: Çay Ağacı ve Portakal Esansiyel Yağ Kombinasyonunun Farklı Konsantrasyonlarının C. albicans ve A. brasiliensis üzerinde Antifungal Etki Sonuçları	40
Tablo 13: Kontrol grubu antibiyotiklerin zon çapları	41
Tablo 14: Tween 20' nin disk difüzyon testi zon çapları	41

RESİMLER

Resim 1: Çay ağacı bitkisi (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	8
Resim 2: Portakal ağacı (<i>Citrus sinensis</i>),	11
Resim 3: <i>S. aureus</i> katı besiyerindeki koloni görünümüleri	15
Resim 4: <i>E.coli</i> katı besiyerindeki koloni görünümüleri.....	16
Resim 5: <i>B. subtilis</i> katı besiyerindeki koloni görünümüleri.....	17
Resim 6: <i>S. typhimurium</i> katı besiyerindeki koloni görünümüleri	19
Resim 7: <i>P. aeruginosa</i> 'nın katı besiyerindeki koloni görünümüleri	20
Resim 8: <i>C. albicans</i> SDA (Sabouraud Dextrose Agar) katı besiyerindeki koloni görünümü	22
Resim 9: <i>B. aspergillus</i> potato dextrose agar (PDA), malt yeast agar (MYA) ve Sabouraud dextrose agar (SDA) üzerinde koloni görüntüleri.....	23

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada çay ağacı ve portakal esansiyel yağlarının hem ayrı ayrı hem de bu iki yağ kombinasyonunun %10-100 aralığında 10 farklı dilisyon hazırlanarak bazı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada mikroorganizmalardan bakteri grubunda *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; patojen mantar grubundan ise *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 kullanılmıştır. Bu çalışma için bakterilerde disk difüzyon yöntemi ve sıvı besiyeri makrodilisyon testi, mantarlarda ise yayma plak yöntemi kullanılmıştır.

BULGULAR: Disk difüzyon testinde çay ağacı yağının tüm bakteriler üzerinde çalışılan dilisyonların neredeyse tamamında inhibisyon zonu oluşmuştur. Portakal yağı ve çay ağacı-portakal yağı kombinasyonunda zon oluşumu daha azdır. Yayma plak çalışmasında, çay ağacı esansiyel yağının %70 ve üstü konsantrasyonlarda daha iyi antifungal etki göstermiştir. Portakal yağında antifungal etki gözlenmemiştir. Portakal- çay ağacı yağı kombinasyonunun %60'lık konsantrasyonundan itibaren antifungal etki gözlenmiştir. Yapılan makrodilisyon testinde ise çay ağacı yağının MİK bulguları çalışılan tüm bakteriler %0,78 olarak, Portakal yağının ise *E.coli*'de % 25, *S. aureus*'da % 1,562'dir. Portakal-çay ağacı kombinasyonunun *E. coli*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* üzerindeki MİK değeri % 0,78, *P. aeruginosa*'da ise %12,5'tir.

SONUÇ: Bu sonuçlar çay ağacı ve portakal yağının çeşitli enfeksiyon hastalıklarına neden olan bazı mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkisi olduğu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: antibakteryal aktivite, antifungal aktivite, antimikrobiyal aktivite, çay ağacı yağı, esansiyel yağlar, portakal yağı

SUMMARY

Investigation of The Antibacterial and Antifungal Effectiveness of Tea Tree And Orange Essential Oil

INTRODUCTION AND AIM: In this study, it was aimed to observe the antimicrobial activity of tea tree and orange essential oils both separately and in combination of these two oils on different microorganisms in 10-100 % the range of 10 different dilutions intervals.

MATERIALS AND METHODS: In the group of microorganisms, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 was used in our study. In this study, disc diffusion method and liquid medium makrodilution test in bacteria and smear plate method in fungi were used.

RESULTS: As a result of the disc diffusion test, zone formation was observed in almost all the dilutions of the tea tree oil on all the bacteria in the dilutions between 10% and 100%. No significant results were found in orange oil and tea tree-orange oil combination. *C. albicans* and *A. brasiliensis* were found to have a better antifungal effect at a concentration of 70% and higher in with tea tree essential oils. No antifungal effect in orange oil. The antifungal effect of orange oil and tea tree oil combination has been observed from 60% concentration. In the macrodilution test, MICs of tea tree oil were determined as 0,78% of all studied bacteria. The value of orange oil was found to be 25% in *E. coli* and 1,562% in *S. aureus*. Orange and tea tree oli combinations were found to be 0,78% on *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus* and MIC on *P. aeruginosa* was 12,5%.

CONCLUSION: These results indicate that tea tree and orange oil have inhibition affect at some microorganizms may cause infection diseses.

Key Words: Antibacterial activity, antimicrobial activity, antifungal activity, esansial oils, orange oil, tea tree oil

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin çok sık kullanılmasına bağlı olarak antibiyotiklere duyarlı olan bakterilerde direnç oluşumu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra bazı bakteriler de doğal yapılarından ötürü antibiyotiklere dirençlidirler (Keyvan ve Özdemir 2016). Direnç oluşumu tedavi amaçlı kullanılan birçok antibiyotik etkisiz hale gelmiştir. Bu da hastalıkların daha şiddetli seyretmesine, hastanede kalış süresi ve ölüm oranı daha yüksek olmasına neden olmaktadır. Ayrıca, daha etkili ve pahalı ilaçların gerekmesi sebebiyle tedavi maliyetleri de yükselmektedir Tüm bu sebepler çalışmaları antimikrobiyal potansiyele sahip bitki uçucu yağlarına ve bitkisel kaynaklı ilaçlara yöneltmiştir. Birçok çalışmada uçucu yağların mikroorganizmalar üzerindeki etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Çelik ve Yuvalı Çelik 2007).

Esansiyel yağlar adı da verilen uçucu yağlar, distilasyon yoluyla veya preslemeyle, bitkilerden elde edilen kompleks içerikli karışımlardır (Bakkali, Averbach, Averbach and Idaomar 2008).

Uçucu yağların antibiyotik ve antiseptik özellikleri bakteriler, küf mantarları ve mayalara karşı gözlemlenebilmektedir. Uçucu yağların antimikrobiyel etkisi, hücre zarında yapı ve işlev değişikliği şeklinde gözlemlenmektedir. Buda patojen mikroorganizmanın enzimatik reaksiyonlarını durdurulması, besin alımını engellenmesi, zarın yapısını değiştirmesi şeklinde etkiler oluşturabilir (Carson, Hammer and Riley 2006).

Çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) ve portakal (*Citrus sinensis*) yağları antimikrobiyal etkisi üzerinde çalışmalar yapılan uçucu yağlar arasındadır (Zhang, Guo, Guo, Jiang and Ji 2018, Federman, Ma and Biswas 2016). Çay ağacı yağı özellikle kosmetik alanda popüler olan uçucu yağlardandır (Zang et al 2018). Çay ağacı yağı yaklaşık %50'si oksijen %50'si dehidrokarbondan olan siklik yapıda terpenden oluşmaktadır. Bu da ona geniş spectrumlu antimikrobiyal etki kazandırmaktadır (Cow et al 2000). Portakal yağı, anti-enflamatuar, antiseptik, anti-depresan, tonik, gaz giderici, antispazmodik, idrar söktürücü ve yatıştırıcı gibi birçok terapötik fonksiyona sahip

olduğu çeşitli araştırmalarca ortaya konmuştur. Portakal yağıda çay ağacı yağında olduğu gibi terpen yapılıdır. Bu da ona antimikrobial etki kazandırmaktadır (Obidi et al 2013).

Yapılan birçok çalışmada çay ağacı yağı ve portakal yağının antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Yapılan literatür incelemesi neticesinde, in vitro koşullarda uygulanan çay ağacı, portakal yağı ve bu iki yađ kombinasyonlarının antimikrobiyal etkinliğinin farklı doz aralıkları ile bağlantılı olarak değişebileceğini dűřündük. Bu amaçla çeşitli mikroorganizmalar üzerinde çay ağacı yağı, portakal yağı ve bu iki yađ kombinasyonunun farklı dilisyon aralıklarında etkinliklerini incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ESANSİYEL YAĞLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Uçucu yağlar, bitkilerin veya bitkisel kaynakların, kök, gövde, yaprak, meyve, kabuk, çiçek gibi kısımlarından su buharı destilasyonu veya farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilirler. Oda sıcaklığında sıvı halde olan, bazen donabilen, kolaylıkla kristalleşebilen genellikle renksiz veya açık sarı renkli, uçucu, kokulu ve yağimsi kompleks karışımlardır. Eter gibi uçucu olduklarından eterik yağ ve güzel kokulu olmaları ve parfüm içeriklerinde kullanılmalarından dolayı da esansiyel yağ gibi isimler verilmiştir (Beyaz 2014). Yağ olarak adlandırılmalarının bir nedeni de su ile karışmamalarıdır. Fakat sabit yağlardan farklıdırlar.

Uçucu yağlar bitkinin daha çok salgı tüylerinde, iç dokulardaki uçucu yağ hücrelerinde ve salgı ceplerinde bulunur. Bitkinin yaprak, çiçek, meyve, kök, rizom ve odununda çok, sap ve kabuklarında ise daha az bulunur. Bazen bitkinin bütün dokularında veya belirli bir kısmında (gül çiçeğinde, tarçın ağacının yaprak ve kabuğunda, nane sapı ve yaprak) da yer alabilir.

Bitkilerin uçucu yağ üretmesinin birçok amacı vardır. Örneğin bitkide gerçekleşen yaralanmalarda antiseptik özellik kazandırması, böceklere karşı savunma mekanizması oluşturması ve cezbedici etkisiyle tozlaşmaya yardımcı olması bunlardan bir kaçıdır. Bunların yanında Akdeniz iklimi gibi sıcak iklim kuşaklarında bulunan uçucu yağca zengin bitkilerde uçucu yağların hızla buharlaşarak bitkisel yüzeylerin soğumasını sağladığı ve bitkinin su kaybını önlediği yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Duru 1993).

Uçucu yağların kimyasal yapılarında bulunan maddeler genel olarak 4 grup altında toplanabilir. Bunlar; terpenik maddeler, aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar, azot ve kükürt taşıyan bileşiklerdir. Uçucu yağların büyük çoğunluğu terpenik maddelerden oluşmuştur (Ceylan 1987). Bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları, bitkinin cinsi, bitkinin hangi bölümünden elde edildiği (çiçek, yaprak, tohum, kabuk gibi), genetik varyasyon, bitki beslenmesi, gübrelemenin uygulanması,

bitkilerin yetiştirildiği bölgenin coğrafik konumu, iklimi, mevsimsel değişimler, büyüme sırasındaki stres, hasat sonrası kurutma ve depolamayı da içeren birçok faktöre bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterebilir. Bunların yanında elde edilme yöntemi de bir uçucu yağın kimyasal bileşenlerini ve böylece karakteristik biyolojik özelliklerini belirler (Alvarez-Castellanos and Pascual-Villalobos 2003).

Tablo 1: Bazı Aromatik Bitkilerin İçerdikleri Aktif Maddeler ve Etki Şekilleri (Şengezer ve Güngör 2008)

Bitki Adı	Bitki Bölümü	Aktif Madde	Etki Şekli
Adaçayı	Yaprak	Cineole	Sindirim uyarıcı, antiseptik
Anason	Tohum	Anathole	Sindirim uyarıcı
Bayır Turpu	Kök	Allylisoithiocyanate	İştah artırıcı
Biber	Tohum	Sabinene	Sindirim uyarıcı, ishal önleyici
Biberiye	Yaprak	Cineole	Sindirim uyarıcı, antiseptik
Defne	Yaprak	Cineole	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı, antiseptik
Hardal	Tohum	Allylisoithiocyanate	Sindirim uyarıcı
Hindistan Cevizi	Tohum	Sabinen	Sindirim uyarıcı, ishal önleyici
Karabiber	Meyve	Piperine	Sindirim uyarıcı
Karanfil	Çiçek	Eugenol	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı, antiseptik
Kekik	Tüm Bitki	Thymol, Carvacrol	Sindirim uyarıcı, antiseptik, antioksidan
Kereviz	Yaprak, Kök	Phtalides	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı
Kimyon	Tohum	Cuminaldehyde	Sindirim uyarıcı
Kişniş	Yaprak, tohum	Linanol	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı
Maydanoz	Yaprak	Apiol	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı, antiseptik
Nane	Yaprak	Menthol	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı, antiseptik
Sarımsak	Soğan	Alicin	Sindirim uyarıcı, antiseptik
Tarçın	Kabuk	Cinnamaldehyde	İştah artırıcı, sindirim uyarıcı, antiseptik
Zencefil	Rhizoma	Zingorole	Sindirim uyarıcı

2.2. ESANSİYAL YAĞLARIN SINIFLANDIRILMASI

Esansiyel yalar; kimyasal bileşenlerine, farmakolojik, aromatik özelliklerine ve terapik etkilerine göre sınıflandırılabilirler.

2.2.1. Kimyasal Bileşenlerine Göre

Esansiyel yağlar, ihtiva ettikleri terpenoidler ve fenilpropanoidler başta olmak üzere 4 grup altında incelenebilirler.

1. Terpenik maddeler
2. Aromatik maddeler
3. Düz zincirli hidrokarbonlar
4. Azot ve kükürt taşıyan bileşikler (Şengezer ve Güngör 2008)

2.2.2. Aromatik Özelliklerine Göre

Aromatik maddeler, uçucu yağ içeriğinde bulunan terpenlerden sonraki önemli bileşik grubudur. Benzen, propilbenzen veya p-simen yapısında olabilirler. Alkol, ester, asit, aldehit, keton, fenol, fenoleter, lakton gibi organik fonksiyonel grupları da içlerinde bulundurabilirler (Bakkali et al 2008).

2.2.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre

Farmakolojik etkilerine göre esansiyel yalar; antiromatizmal, antitussif (öksürük giderici), diüretik (idrar söktürücü), antimikroobiyal, dezenfektan gibi sınıflandırılmaları yapılabilir. (Lee, Everts and Beynen 2004, Şengezer ve Güngör 2008).

2.3. ESANSİYAL YAĞLARIN ELDE EDİLME YÖNTEMLERİ

Esansiyel yağın kullanım amacına bağlı olarak, yağ elde edilme yöntemi farklılık göstermektedir. Parfüm üretiminde kullanılacak esansiyel yağın üretimin de çözücü ekstraksiyonu veya süperkritik karbondioksit yöntemi kullanılmaktadır. Turuncgillerden antibakteriyal, antifungal, gıda katkı maddeleri ve farmakolojik

amaçlı sentetik kimyasallara muadil üretilecek yağlarda daha çok mekanik ekstraksiyon ve buhar destilasyonu tercih edilmektedir (Bakkali et al 2008).

2.3.1. Damıtma (Destilasyon) Yöntemi

Bileşenleri kaynama noktaları arasındaki farklardan yararlanarak ayırma işlemidir.

2.3.1.1. Su destilasyonu

Eskiden beri yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Soğutucu ile irtibatlandırılan bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin bir soğutucu yardımıyla yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılması esasına dayanmaktadır. Elde edilen uçucu yağ miktarı volumetrik olarak ifade edilir. Su destilasyonu en iyi toz halindeki materyallerde (örneğin; kök ya da odun unu) sonuç vermektedir. Bu yöntemle miktarca fazla yağ elde edilmesi bir avantaj olsa da, yüksek sıcaklıktan ötürü termal degradasyon olmakta ve yağın niteliği düşmektedir (Kılıç 2008).

2.3.1.2. Buhar destilasyonu

Bu yöntemde taze bitki materyali cam kap içine konulur. Cam kaba basınç yardımı ile uygulanan buhar, yağ damlacıklarını da sürükler ve yağın toplama kabına getirir. Yağ burada yoğunlaştırılarak buhardan ayrıştırılır.

2.3.1.3. Vakum destilasyonu

Kaynama noktaları çok yüksek olan ya da kaynama noktasında dekompoze olabilen sıvıların distilasyonunda kullanılır. Bu bileşikleri elde etmek amacıyla sıcaklığı artırmak yerine basıncı düşürülür. Basınç bir kez bileşiğin buhar basıncının altına indirilirse, kaynama ve destilasyon işlemi başlamaktadır.

2.3.2. Ekstraksiyon Yöntemi

Genel anlamda bir çözücü içerisinde uçucu yağ ekstrakte edilmesi işlemidir. Çözücü ekstraksiyonu, Süper kritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalgayla ekstraksiyon, sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu, Katı-faz mikro ekstraksiyon, çok yönlü ekstraksiyon olmak üzere farklı ekstraksiyon yöntemleri vardır (Evren ve Tekgüler 2011). Mikrodalga ekstraksiyonu ve katı-faz mikroekstraksiyonu gibi modern yöntemler diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre nitelik olarak iyi sonuçlar vermektedirler. Fakat daha fazla maliyet gerektirmektedirler. Modern yöntemlerin,

daha kısa sürede sonuç vermesi, daha az çözücü madde kullanılarak çevre sağlığına yaptığı olumlu katkı, daha kaliteli vermesi gibi nedenlerden ötürü son yıllarda daha çok kullanılmaktadır (Kılıç 2008).

2.3.3. Mekanik Yöntem (Presleme)

Genellikle portakal ve limon gibi turunçgil kabuklarından esansiyel yağ elde etmede kullanılan bir yöntemdir. Kabuklardaki uçucu yağ destilasyon yöntemleri ile bozunmaya uğradığından mekanik yöntem tercih edilmektedir. Meyvelerin kabukları bez bir torbaya koyulur ve soğuk hidrolik presler ile sıkılarak uçucu yağlar elde edilmesi sağlanır (Ceylan 1983, Kılıç 2008).

2.4. ESANSİYAL YAĞLARIN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

Çeşitli bitki türlerinden elde edilmiş uçucu yağların insanlarda hastalığa etkeni olan bakteriler ve virüslere karşı etkinlikleri yapılan in-vitro denemeler ile ortaya koyulmuştur. Örneğin; kekik, tarçın, limon çayı, defne, çay ağacı, karanfil ve gül ağacı yağlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları ve bu yağların MİK değerlerinin farklı bakteri türlerine karşı %1'den (hacim/hacim) daha düşük olduğu bulunmuştur (Hammer, Carson and Riley 1999, Oussalah, Caillet, and Lacroix 2006). Defne, karanfil, limon otu ve kekik yağlarının düşük konsantrasyonlarda *E. coli* üzerine inhibe edici etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. *S. aureus*'u fesleğen ve okaliptüs yağları %1'lik konsantrasyonda inhibe ederken; kekik, biberiye, nane, limon otu, karanfil ve defne yağı, %0,05'lik konsantrasyonlarda inhibe ettiği ortaya konmuştur (Hammer, Carson and Riley 1999, Hammer and Carson 2011). Sarımsak, limon mersini ve çay ağacı yağları, metisiline dirençli *S. aureus*'a karşı çok etkili olduğu bulunmuştur (Tsao and Yin 2001, Hayes and Markovic 2003). Uçucu yağların antimikrobiyal etki konsantrasyonlarının bakteri türleri arasında farklılık göstermektedir. *Pseudomonas spp.* ve *Proteus spp.*'in diğer test edilen türler ile kıyaslandığında en dirençli bakteri türleri oldukları çalışmalarda ortaya konmuştur (Kürekci and Sakin 2017). Uçucu yağların tek başına antimikrobiyal etkinliğinin yanında birçoğunun kombinasyon halinde kullanıldığında sinerjik antimikrobiyal etkinlik de göstermektedir (Garcia-Garcia, Lopez-Malo and Palou

2011). Uçucu yağın bileşiminde bulunan bazı ana moleküllerin uçucu yağdan daha iyi bir etkiye sahip olduğunu ve örnek olarak; *Syzygium aromaticum* (karanfil) yağından karvakrol ve öjenol veya *Melaleuca alternifolia* (çay ağacı) yağı içinde terpinen-4-ol'ün elde edildikleri yağlardan daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca fenolikler ve aldehitler içeren uçucu yağların genellikle daha iyi antibakteriyal etki sergilediği not edilmiştir (Carson, Hammer, Riley 2006). Buna ilaveten, bitki kaynaklı yağların, bakteriyel antibiyotiklere karşı iyi tolerans gösteren biyofilmlere karşı antibakteriyel potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir (Galvao et al 2012).

2.5. ÇAY AĞACI ESANSİYAL YAĞI



Resim 1: Çay ağacı bitkisi (*Melaleuca alternifolia*)

(<http://www.bitkicenter.com/cay-agaci/> Erişim Tarihi: 20.04.2019)

Camellia sinensis, *Kunzea ericoides*, *Leptospermum scoparium*, *Leptospermum petersonii*, *Melaleuca alternifolia* gibi farklı bitki türleri çay ağacı olarak adlandırılabilir. Bunlardan en popüler olanı *Melaleuca alternifolia* bitkisidir. Bu aromatik türlerin bazıları, Avustralya yerlileri tarafından ve Avrupa'daki erken yerleşimciler tarafından idrar yolu rahatsızlıkları, bağırsak şikayetleri, öksürükler, soğuk algınlığı, cilt hastalıkları, yanıklar, ağız yıkamaları dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarda tedavi edici olarak kullanılmıştır. Bu aromatik bitki türlerinden en

popüleri ve üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmış ve ticari değer taşıyanı *M. alternifolia* türüdür (Van Vuuren, Docrat, Kamatou and Viljoen 2014).

Çay ağacı yağı, Avustralya'da yetişen *Melaleuca alternifolia* çalısının yapraklarından elde edilen bir uçucu yağdır (Carson et al 2006). Bitkinin cins ismi olan *Melaleuca* ismi, bitkinin büyümesi sırasında gövde kabuklarındaki renk değişimini ifade etmek üzere Yunanca'da mela-: siyah ve leuc(o)-: beyaz anlamına gelen kelimelerden türetilmiştir. Bu cinse ait yaklaşık 230 tür bulunmaktadır. Tıbbi olarak kullanılan *Melaleuca alternifolia* türü doğal olarak Avustralya'da yetişmektedir. Bitki Nisan-Eylül aylarında çok miktarda suya ihtiyaç duyar ve killi topraklarda yetişir. Boyu 7 metreye kadar ulaşabilmektedir. Ağaç şeklindeki bu türün genç filizleri sık yumuşak tüylerle kaplı iken yaşlı dallarında tüy bulunmamaktadır. Tıbbi olarak kullanılan kısım olan yaprakları 1- 2,5 cm uzunluğundadır ve bu yapraklar "Tea tree oil (TTO)" olarak bilinen değerli esansiyel yağın kaynağıdır (Tezgül Çakır , Kaleağası ve Kökdil 2005). *M. alternifolia* bitkisinin ilk tıbbi kullanımı, bitkinin doğal olduğu bölge olan Kuzey Yeni Güney Galler'deki Bundjalung Aborjinleri tarafından olmuştur (Carson and Riley 1993). Avustralya halkı çay ağacı yağını baş ağrılarında, soğuk algınlığında, böcek ısırıklarında ve cilt enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanmıştır. Bitkinin soluk sarı renkli uçucu yağı fenolden daha etkili bir topikal antiseptik olarak 1920'li yıllarda keşfedilmiştir.(Calcabrini et al 2004, Messenger, Hammer, Carson and Riley 2005)

2.5.1. Çay Ağacı Yağının (TTO) Kimyasal ve Antimikrobiyal Özellikleri

Çay ağacı yağı, terpen hidrokarbonlardan, özellikle monoterpenlerden, seskiterpenlerden ve bunlarla ilişkili alkollerden oluşur. Terpenler uçucu, aromatik hidrokarbonlardır ve C_5H_8 formülüne sahip olan izopren polimerleri olarak kabul edilebilir yapılan seminal çalışmalarda, 800'den fazla Çay ağacı yağı örneği gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile incelemiş ve yaklaşık 100 bileşen ve konsantrasyon aralığını bildirmiştir (Carson et al 2006). Ticari olarak satılan yağ bileşiminin, maksimum ve / veya minimum değerleri belirleyen "Melaleuca Yağı terpinen-4-ol tipi" için 14 bileşen standardize edilmiştir (International Organisation for Standardisation 2004).

Yağın yapısında bulunan siklik yapıda terpen yağa geniş spectrumlu antimikrobiyal etki kazandırmaktadır (Cox et al 2001). Çay ağacı yağına antimikrobiyal özellik kazandıran asıl bileşenler 1,8-sineole, terpinen-4-ol ve a-terpilenol'dür (SharifiRad et

al 2017). 1,8-sinyalin *E. coli*'nin hücre membranını tahrip ettiği, terpinen-4-ol ise güçlü antibakteriyel, dezenfeksiyon ve anti-korozif etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca α -terpilenolün yüksek penetrasyona sahip olduğu ve *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* gibi yaygın patojenler üzerinde öldürücü bir etki gösterdiği gösterilmiştir (Dettwiller et al 2016, Rieder 2016). İnsanlar üzerinde toksik etki göstermediği, tahriş edici ve aşındırıcı olmadığı gösterilmiştir. Doğal bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bu nedenle de gıdalarda anti bakteriyel bir ajan olarak kullanılabilirliği çalışmalarda gösterilmiştir. Tütün bitkisinde görülen mozaik virüsüne karşı etkili bir önleyici olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Bishop 1995). Bunların yanın da oksijene, ışığa veya sıcaklığa duyarlılığı, genel uygulanabilirliğini düşürebilmektedir. (Lin, Chen, Zhou, Zhou and Xu 2018).

Tablo 2: Melaleuca alternifolia uçucu yağının kimyasal içeriği (Intorasoot, Chornchoem, Sookkhee and Intorasoot 2017)

İçerik	İçerik yüzdeleri	
Terpinen-4-ol	31,11	γ -
Terpinen	25,30	α -
Terpinen	12,70	1,8-
Sineol	6,83	ρ -
Simen	4,23	Terpinolen
4,03 Limonen		2,50
α -Terpineol		2,35
Aromadendrene	1,75	δ -
Kadinin	1,41	Sabinin
0,28 Globulol		0,24
Viridiflorol	0,14	Total
92,8		

2.6. PORTAKAL YAĞI



Resim 2: Portakal ağacı (*Citrus sinensis*),

(<https://tr.redsearch.org/images/4576100> Erişim tarihi: 26.04.2019)

Tatlı portakal (*Citrus sinensis*), 7,5 -15 m arasında uzunluğa sahip olabilen, yaprak dökmeyen ve yaz kış yeşil olan bir ağaçtır. Kökeni Güney Çin' e dayanmaktadır ancak ticari olarak dünya çapında tropikal, yarı tropik bölgelerde ve ılık ılıman bölgelerde yetiştirilmektedir (Hamendra and Anand 2007). Portakal ağaçları, genellikle yaprak saplarında dar kanatlar taşıyan, eliptikten oval, 6,5-15 cm uzunluğa ve 2,5 ila 9,5 cm genişliğe kadar değişen, farklı biçimlerde kösele ve dökmeyen yapraklar üretir. Tek yaprakları ya da tek tek ya da 6 yaklaşık 5 cm genişliğinde, 5 yaprakları ve 20-25 sarı organlarındaki kokulu. Küçük, beyaz veya mor kokulu hermafrodit çiçekler, böcekler tarafından tozlaşma için nektar üretir. Meyveler yaklaşık 6,5 ila 9,5 cm genişliğinde olan ve olgunlaştıklarında turuncu veya sarı renktedirler.

Meyveler insanoğlunun bildiği en eski yiyecek formlarından biridir. Eski zamanlardan beri, dünyadaki farklı kültürlerde bitkiler birçok hastalık için şifa kaynağı olarak kullanılmışlardır (Van Vuuren, Docrat, Kamatou and Viljoen 2014). Bunların yanında narenciye kabuk yağlarının kimyasal bileşimi, besin değeri ve birçok fitokimyasal bakımından zengin oldukları çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur Abalaka and Bello 2006, Al-Ani, Al-Haliem and Tawfik 2010). Turunçgil kabuğu diğer bitkilerde çok nadir bulunan zengin bir flavonon ve polimetoksilen flavon kaynağıdır (Anitha , Hemapriya, Mathivathani, Ramya and Monisha 2016). Turunçgil meyveleri ağırlıklı

olarak tatlı olarak kullanılır, ancak kabuğundan dünya çapında önemli ekonomik değeri olan esansiyel bir yağ üretilir. Bu esansiyel yağ İlaç endüstrisinde hoş olmayan tatları maskeleyerek için aroma maddeleri olarak kullanılır (Bourgou, Rahali, Ourghemni and Tounsi 2012). Gıda endüstrisinde lezzet verici olarak kullanılır (Caccioni, Guizzardi, Biondi, Renda and Ruberto 1998). Bunların yanında portakal yağı, anti-enflamatuar, antiseptik, anti-depresan, tonik, gaz giderici, antispazmodik, idrar söktürücü ve yatıştırıcı gibi birçok terapötik fonksiyona da sahiptir (Wynnchuk 1994, Kierman 2008).

C. sinensis'in medikal etkisi ise, bakteri ve virüsler gibi yabancı antijenlere saldıran nötrofiller olan beyaz kan hücrelerinin üretimini teşvik ettiğine inanılan yüksek C Vitamini içeriğine bağlıdır. Virüslü istilacılara ve kanser hücrelerine karşı korumaya yardımcı olan proteinler ve interferon üretimi ile bağışıklığı artırır (Forbes, Sahm and Weissfeld 2007).

2.6.1. Portakal Yağının Kimyasal ve Antimikrobiyal Özellikleri

Soğuk preslenmiş Valencia portakal yağının ana bileşenleri% 20,2 linalool,% 18,0 dekanol, % 14,1 sitral, % 5,8 a-terpineol, % 5,2 valenen, % 4,1 dodekanal, % 3,9 sitronellal ve % 0,3 limonendir (Nannapaneni et al 2009). Yağ içeriğinde bulunan limonen, sindirime yardımcı olmak ve sindirim sistemini detoksifiye etmek, kabızlığı giderir, kan dolaşımını kolaylaştırmak, C vitamini emilimini arttırmak, soğuk algınlığı ve grip ile mücadelede bağışıklık sağlamak, cildi güçlendirmek ve gençleştirmek gibi bir sürü özelliğe sahiptir (Obidi et al 2013). Tüm bunların yanında Limonenin antimikrobiyal ve antiseptik aktivitesi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Magwa, Gundidza and Gweru 2006). Linalool ve dekanol ise *S. aureus* üremesinin engellenmesinde etkilidir. Sitral, *S. aureus* gibi çeşitli bakteriyel patojenleri ve ayrıca patojenik mantarları inhibe ettiği çalışmalarda gösterilmiştir (Liu, et al 2012). Narenciye kabuğundaki diğer potansiyel antimikrobiyal bileşenler, D-limonen, terpenler, seskiterpen, oksijenli monoterpen, linalool, asit esterleri, alifatik hidrokarbonlar ve diğer tanımlanamayan hidrokarbonlardır. Yağ içeriğinde bulunan terpenoidler lipofilik özellikleri sayesinde bakteri duvarını delerek hücrenin iç kısımlarına ulaşabilmektedirler (Bayaz 2014). Narenciye kabuğu ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*,

Shigella species and *Candida albicans* gibi çeşitli gıda kaynaklı patojenler üzerinde olduğu saptanmıştır (Hasija, Ibrahim and Wadia 2015).

2.7. MİKROORGANİZMALAR

İnsanlığın yaşamını devam ettirmek için, diğer canlı türleri ile mutlak etkileşim içinde olması gerekmektedir. Bu etkileşimin büyük bir kısmı boyut olarak mikroskopla görülebilecek kadar küçük, ancak fonksiyonel ve sayısal olarak büyük olan mikroorganizmalar ile gerçekleştirmektedir (Sekirov, Russell, Antunes and Finlay 2010). İnsan ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimi incelerken, insan vücuduna zarar veren mikroorganizmalar ve zararsız ya da insana faydalı olan mikroorganizmalar diye gruplandırma yapılabilir (Curtis and Sperandio 2011). İnsan ile etkileşim halinde olan mikroorganizmalar denildiğinde virüs, bakteri, arke ve tek hücreli ökaryotlar sıralanabilir (Eberl 2010). İnsan vücuduna zarar veren mikroorganizmalar patojen olarak adlandırılır. İnsan vücudunun zarar görmediği durumdaki mikroorganizmalar ise flora, mikrobiyota ve mikrobiyom gibi isimlerle adlandırılır (Curtis and Sperandio 2011).

Bazı durumlarda normal koşullarda non-patojen olarak bilinen bir mikroorganizma, immün yetmezlik, çevre koşulları, disbiyozis gibi değişken koşullarda patojen davranış gösterebilmektedir (Eberl 2010). Patojenlerin insan vücudunu konak olarak kullanabilmek için insan savunma mekanizmalarını geçmesi gereklidir. Bu mekanizmalar doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemleri tarafından yapılan savunmalardır. Mikroorganizmanın oluşturacağı enfeksiyonun şiddeti ve mortalite yeteneği patojen mikroorganizmanın virülansı ile doğru orantılıdır. Konak immün sisteminin gücü ile de ters orantılıdır. Bu faktörlerin birbiri üzerindeki güçlerinin kıyaslanması sonucunda mikroorganizmanın enfeksiyon oluşturma şiddeti belirlenir (Çetin ve ark 2015).

2.7.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus, birçok ülkede yaygın gıda zehirlenmesi neden olan ikinci veya üçüncü patojen bakteri olarak gösterilmiştir. ABD’de her yıl gıda kaynaklı hastalıklar

nedeniyle 6-80 milyon insanın etkilendiği ve bunların yaklaşık 9000'inin ölümlerine sebep olmaktadır. Ayrıca yıllık yaklaşık 5 milyar dolarlık ekonomik kayba sebep olduğu çalışmalarda belirtilmiştir (Erol ve İşler 2004).

Staphylococcus türleri *Micrococcaceae* familyasına aittir. Gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz ve katalaz pozitif bakterilerdir (Küçükçetin ve Milci 2008). Bu familyada yer alan *S. aureus*, ısıl işlem gibi mikroorganizma sayısının azaltılması için uygulanan tüm yöntemlere karşı duyarlılık göstermektedir. Fakat insanlarda zehirlenmeye neden olan ve ısıl işleme dayanabilen enterotoksinler üretebilmektedir (Tükel ve Doğan 2000). Genellikle protein ve nişasta içeren gıdalarda üremesi olan *S. aureus*; özellikle et ve süt ürünleri, balık, patates, makarna ile bunlardan yapılan yiyeceklerde yaygın olarak görülmektedir. Hijyenik ortamlarda üretilmeyen ve muhafaza edilmeyen, açıkta bekletilen yiyecekler stafilokokal zehirlenmesine neden olabilmektedir (Küçükçetin ve Milci 2008). Stafilokokal intoksikasyonlar, enterotoksin (20ng < 1µg) içeren gıdaların tüketimine bağlı olarak şekillenmekte ve belirtiler 0,5-6 saat (genellikle 2 saat) gibi kısa sürede ortaya çıkmaktadır (Keyvan ve Özdemir 2016). Stafilokokal enterotoksinler ayrıca, spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonları da sahiptirler (Harris, Grossman, Kappler, Marrack and Rich 1993).

Gıda zehirlenmelerinin yanında *Staphylococcus aureus*, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli etkenlerden biridir ve çok sayıda cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile birlikte yaşamı tehdit eden pnömoni, bakteriyemi, osteomyelit, endokardit, sepsis ve toksik şok sendromu ile ilişkilidir (David and Daum 2010). *S.aureus*'u önemli kılan bir diğer nedense başta penisilin olmak üzere sefalosporin, eritromisin, metisilin, oksasilin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin gibi çoğu antibiyotiğe karşı dirençli olmasıdır (Keyvan ve Özdemir 2016). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları artış göstermektedir (Culos, Cannon, Grim 2011). Yapılan bazı çalışmalarda, yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i metisiline dirençli saptanmıştır. Ayrıca bazı merkezlerde Metisilin'e dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında görülen vankomisin duyarlılığında azalma gözlenmiştir (Ippolito, Leone, Lauria, Nicastr and Wenzel 2010).



Resim 3: S. aureus katı besiyerindeki koloni görünümleri

A.Nütrient Agar Üremesi B.Mannitol Salt Agar Üremesi B.Kanlı Agar Üremesi

(A: <http://www.keywordhouse.com/YWdhciBwbGF0ZSAxNiBiYWNRiHVw/>, B: <https://microbeonline.com/mannitol-salt-agar-msa-composition-uses-and-colony-characteristics/>, C: <https://www.bigstockphoto.com/tr/image-151679684/stock-photo-staphylococcus-aureus> Erişim tarihi: 20.04.2019).

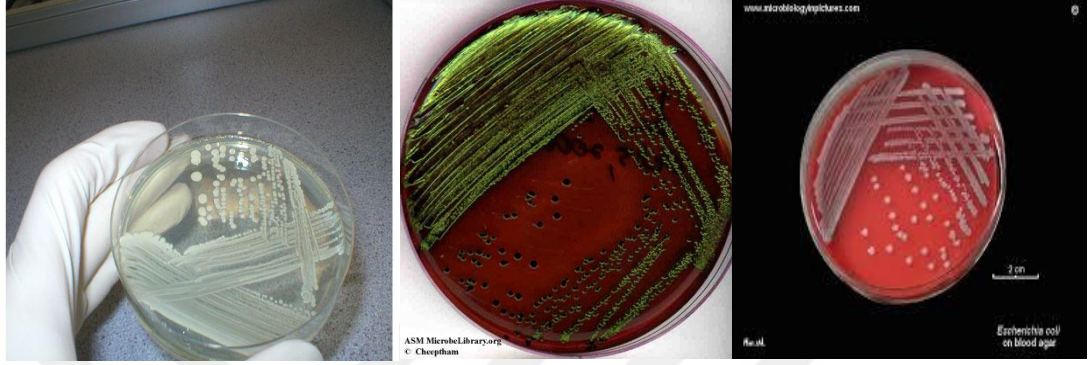
2.7.2. *Escherichia coli*

E. coli hayvanların ve insanların bağırsak sistemlerinin normal florasında bulunabilen bir bakteri türüdür. Aynı zamanda bir çok bakteri kaynaklı enfeksiyon etkenidir. Üriner sistem enfeksiyonları, bağırsak enfeksiyonları, pnömoni, menenjit ve bakteriyemiye neden olmaktadır. Patojen türler virülans özellikleri, patojenite mekanizmaları, klinik sendromlar ve O, H serotiplerine göre sınıflandırıldığında başlıca; enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvasiv (EIEC), enterohemorajik (EHEC), difuz- adhering (DAEC) ve entero- agregatif (EaggEC) olmak üzere altı grupta toplanmaktadır (Ustaçelebi 1999, Tosun ve Aktuğ Gönül 2003).

Hastalık oluşturan en önemli formu O157:H7 (Enterohemorajik *E. coli*, Verotoksijenik *E. coli*) gıda zehirlenmeleri ile sulu ve kanlı ishallere neden olmaktadır. Özellikle gelişmemiş ülkelerde, hijyenik olmayan ortamlarda, kontamine olmuş etler ve sularla bulaş olmaktadır (Özkuyumcu 2009, Padhye and Doyle 1992).

Kanlı agar, nutrient agar ve enterobakterin diferensiyel ve selektif besiyerlerinde (MacConkey, EMB agar gibi) 37°C'de 24 saatte üremesi gözlenebilen S tipi koloniler oluştururlar. MacConkey agarda pembe koloniler oluştururken, EMB agar da metalik refle veren koloniler oluştururlar. Nutrient buyyonda 37°C'de 24 saatte bulanıklık

oluşturarak ürerler. İndol ve Metil Red testleri pozitif, Sitrat ve Oksidaz testleri ise negatiftir (<http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/944105010.pdf> (Erişim tarihi: 12 04 2019)).



Resim 4: E.coli katı besiyerindeki koloni görünüşleri

A. TSA Üremesi

B. EMB üremesi

Kanlı Agar Üremesi

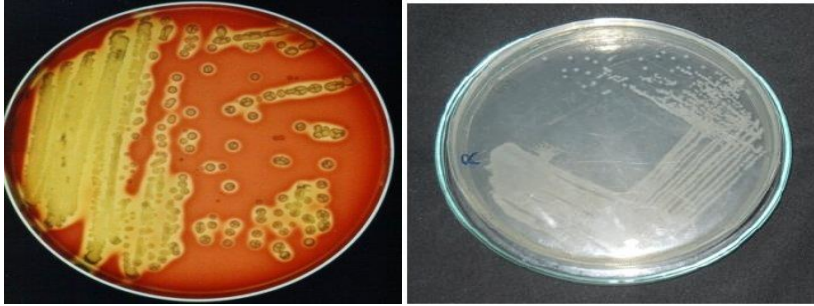
(A: <http://21stcenturnaturalist.blogspot.com/2011/06/knowning-your-e-coli.html>, B: https://www.researchgate.net/figure/Left-Ecoli-on-MacConkey-agar-Right-Ecoli-on-EMB-agar_fig21_290911856, C: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/escherichia%20coli%20photos/escherichia%20coli%20001.html> Erişim tarihi: 20.04.2019).

2.7.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus cinsi bakteriler toprak, hava, su gibi çevremizde çokça bulunurlar. Aerobik Gram pozitif basillerdir. Endospor oluştururlar (Özkuyumcu 2009). Laboratuvar tanısında Trypticase Soy Agar, Nutrient Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi üredikleri bilinmektedir. Karbon kaynağı olarak organik asit ve amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişim gösterirler (Kaynar ve Beyatlı 2006). Gaz oluşturmadan asit üretirler. Ayrıca, Şekerleri fermente ederler. Proteinleri ise, amonyak oluşturarak parçalarlar. Buda kokuşmaya neden olur (Kalkan ve Halkman 2006).

Bacillus subtilis, kirpikli bir basil olduğu için hareketlidir. Sporları ovaldır ve hücrenin uç kısmında bulunurlar. Sporlar bakteriye yüksek sıcaklık ve kurak gibi ekstrem koşullara karşı dayanıklılık sağlar. *B. subtilis*, proteazlarında içinde bulunduğu çeşitli enzimler üreten bu sayede doğada çözünme sağlayarak madde döngüsüne katkıda bulunan saprofit bir bakteri türüdür (Piggot and Hilbert 2004). *B. subtilis*, endüstriyel olarak enzim ve özel kimyasalların üretiminde en yaygın kullanılan bakterilerden biridir. Ürettiği amilaz, proteaz, inosin üretimi, ribozitler ve amino asitler yaygın olarak kullanılır (Aslım, Sağlam, Beyatlı 2002).

Göz ve diğer dokulara bulaşarak enfeksiyon oluşturabilirler. Ayrıca gıda zehirlenmelerine de yol açmaktadırlar (Kalkan ve Halkman 2006). Özellikle süt içerisinde çoğaldıklarında kazein parçalar ve zehirli maddeler oluştururlar. Diğer besin maddelerinde de üreyerek toksin oluşturabilirler. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde menenjit, endokardit, endoftalmit, gastroenterit gibi çeşitli hastalık tabloları oluşturmaktadır (Altındış 2013). Bakterinin kuluçka süresi 2-18 saat aralığındadır (Arslan, Erginkaya, Özasan, Kılıç ve Ünal 2013).



Resim 5: *B. subtilis* katı besiyerindeki koloni görünüşleri

A: Kanlı Agar Üremesi

B: Nutrient Agar Üremesi

(A:http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Bacillus_subtilis/ Erişim Tarihi: 26.04.2019)

B : Malarkodi et al 2013).

2.7.4. *Salmonella typhimurium*

Salmonella, Enterobacteriaceae ailesinde yer alan, insan ve hayvanların bağırsaklarında kommensal ya da patojen olarak yaşayabilen ve tüm dünyada yaygın olarak bulunabilen bir bakteri türüdür. Canlılar üzerinde yaşamasının yanı sıra toprak ve suda da yaşam alanlarıdır. (Özkuyumcu 2009). *Salmonella* cinsindeki bakteriler lipopolisakkarid O (somatik) ve protein H (kirpik-flagella), Vi (kapsüler) antijenlerinin farklılıkları göz önüne alınarak 1926'larda White'in düzenlediği ve 1972-1978'de Kauffmann'ın genişlettiği şemaya göre, serotiplendirilmişlerdir (Erdem 1999). En sık gözlemlenen serotipleri A, B, C1, C2, C3, D1 ve E1'dir. *S. typhimurium* bu serotiplerden B grubunda bulunmaktadır. (Özkuyumcu 2009, <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/9443105030.pdf>, https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Salmonella_typhimurium (Erişim: Tarihi:12.04.2019).

Salmonella serotiplerinin bazıları sadece insanlarda yerleşim gösterirken *S. typhimurium* gibi konak seçimi geniş olanlar hem insanlarda hem de hayvanlarda gastroenterit oluştururlar.

Gastroenteritte, *S. typhimurium*'un kuluçka süresi 6-48 saat aralığında değişkenlik göstermektedir. Enfeksiyon baş ağrısı, bulantı ve kusma ile karakterize ani başlangıçlıdır. Dışkılama süresi 6-10 arasında değişebilen ishal görülür. 2-3 günde normale dönebilen 39°C ile seyreden ateş görülebilir. *Salmonella* etkenli gastroenterit 3-7 günde kendini sınırlayan bir enfeksiyondur. Ölüm nadir görülür genellikle AIDS li hastalarda ölüm vakaları bildirilmiştir. Ayrıca *S. typhimurium* suşlarının Çoklu ilaç direnci gösterdiği de ülkemizde yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Otkun, Erdem ve Akata 2001).

Salmonella 0,4-0,6 µm eninde, 2-3 µm boyunda Gram negatif bir basildir. Bazı serotipleri dışında genellikle hareketlidir. Spor oluşturmazlar. Fakültatif anaerob bakterilerdir. Genellikle S tipi koloni oluşturmalarına rağmen M tipi koloni oluşturanları da vardır. Optimum üreme sıcaklığı 37°C olmasına rağmen 7-48°C aralığında da üreme gösterebilirler. Genel kullanım besiyerlerinde 24-48 saat içerisinde S tipi koloniler oluştururlar. Kristal viyole, malaşit yeşili, selenit gibi bazı kimyasal boyalara karşı dirençli oldukları için *Salmonella* izolasyonu için seçici

besiyerleri olan Salmonella-Shigella Agar (SS Agar), Heklosen Enterik Agar (HE Agar), Selenit F Agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır. Salmonella cinsi bakterilerin çeşitli biyokimyasal testleri ve sonuçları tablo'da gösterilmiştir. Laboratuvar tanısında glikoz ve arabinoz, maltoz, sorbitol gibi bazı karbonhidratlarda asit oluştururlar ve çoğunlukla gaz oluşumu gözlemlenir. Sitrat, lizin ve ornitin dekarboksilaz pozitifdir. İndol, üreaz, fenilalanin deaminaz negatifdir. H₂S pozitif olması ve glikoz fermantasyonu sonucu gaz oluşturması en önemli ayırt edici özelliğidir (Özkuyumcu 2009).



Resim 6: S. typhimurium katı besiyerindeki koloni görünüşleri

A: XLD Agar Üremesi

B: SS Agar Üremesi

C: TSA Üremesi

(A:<https://microbenotes.com/salmonella-typhimurium-on-xld-agar/>,

B:

<https://www.shutterstock.com/tr/search/salmonella+shigella+agar>,C:

[https://paramedicsworld.com/salmonella-typhi/morphology-culture-characteristics-](https://paramedicsworld.com/salmonella-typhi/morphology-culture-characteristics-of-salmonella-typhi/medical-paramedical-studynotes#.XLt4rOgzblU)

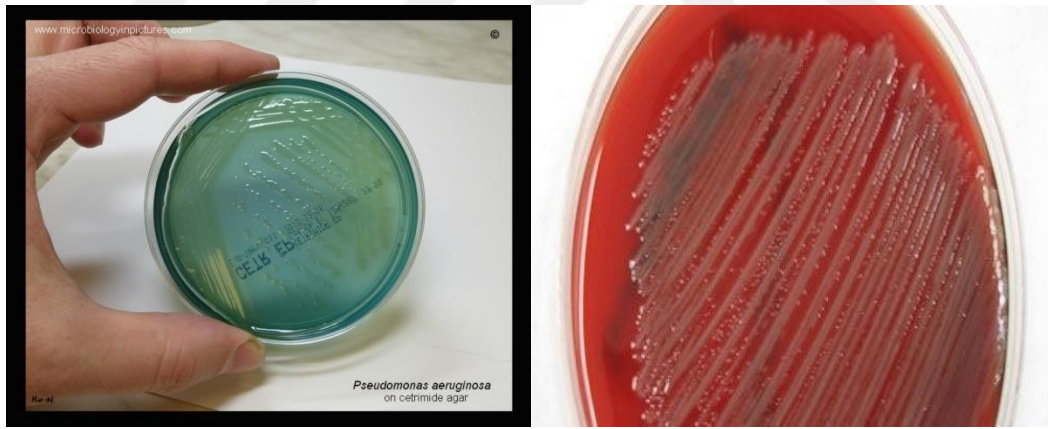
[of-salmonella-typhi/medical-paramedical-studynotes#.XLt4rOgzblU](https://paramedicsworld.com/salmonella-typhi/morphology-culture-characteristics-of-salmonella-typhi/medical-paramedical-studynotes#.XLt4rOgzblU) Erişim tarihi: 20.04.2019)

2.7.5. Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alan Pseudomonas cinsi bakterilerin çoğu doğada toprak ve sulara çokça bulunurlar (Şen ve Halkman 2006). Bazı türleri ise bitkiler ve hayvanlar içinde patojen olarak yaşarlar. Pseudomonas'lar 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda ve sporsuzdurlar. Pseudomonas cinsi bakteriler gram negatif ve çubuk şeklindedirler. Oksidaz ve katalaz pozitiflerdir. Sıvı besiyerinde zar oluşturarak ürerler (Özkuyumcu 2009). Polar flagellaları sayesinde hareketlidirler ve zorunlu aerobtur. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların

yüzeyinde hızla gelişirler. Gıda üzerine okside ürünler ve mukoz madde oluşmasına neden olurlar. Kendi gelişmeleri sağlayan gelişme faktörleri ve vitaminleri sentezleme özelliğine sahiptirler. Psikrofil, mezofil veya psikrotrof türleri vardır. Özellikle soğukta saklanan süt, et, yumurta ve deniz ürünlerinin bozulmasında birinci etken olarak gösterilirler. Isı, kuruluk ve radyasyona karşı duyarlıdır bu yüzden böyle ortamlarda çabuk inhibe olurlar. Bazı gıdalar üzerinde *Pseudomonas nigrificans* siyah, *Pseudomonas fluoresans* yeşilimsi, diğer türleri ise kahverengi pigment oluşturdukları gözlemlenmiştir (Şen ve Halkman 2006, Keskin ve Ekmekçi 2008). 42°C'de üremeleri tanıyı kolaylaştırır (Özkuyumcu 2009).

P. aeruginosa hastane infeksiyonu etkeni bakteri türleri içinde ilk sıralarda yer almaktadır. Birçok antibiyotik çeşidine karşı direnç geliştirebilmektedir. Bunun yanında oluşturduğu infeksiyonlar nedeniyle yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Bu da onları klinik açıdan önemli kılmaktadır (Gül, Şensoy, Çetin, Korkmaz ve Seber 2004). Penisillin ve dezenfektanlara dezenfektanlara karşı direnç oluştururlar (Keskin ve Ekmekçi 2008).



Resim 7: P. aeruginosa'nın katı besiyerindeki koloni görünüşleri

A. Ceftrimide Agar Üremesi

B. Kanlı Agar Üremesi

(A: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/p-aeruginosa-ceftrimide.html>)

B: https://www.researchgate.net/figure/Figure1-Show-Pseudomonas-aeruginosa-colony-on-blood-agar_fig1_316674392 Erişim tarihi: 20.04.2019)

2.7.6. *Candida albicans*

Candida cinsinde bulunan maya mantarı türleri insanlarda deri ve gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem ve solunum sistemi mukozalarının normal florasında bulunabilir. Bunun yanında toprak ve besinlerde de üreyebilir (Seyedmousavı ve ark 2015).

Candida türleri 4-6 µm çapında, 80S ribozomları bulunan ökaryot, tek hücreli canlılardır. Tomurcuklanarak ürerler. Gerçek ya da yalancı hifler oluşturabilirler. Fakültatif anaropturlar (Koçoğlu 2013).

Candida'ların 200'den fazla sayıda türü bulunur. Bunlar arasında invazif olmayan deri ve mukoza kandidozuna en sık neden olan *Candida albicans* türüdür. Deri ve mukoza enfeksiyonları içerisinde pamukçuk, *Candida* özefajiti, gastrointestinal kandidoz, *Candida* vaginiti ve deri kandidozu, derin yerleşimli enfeksiyon türleri ise kronik dissemine kandidoz (hepatosplenik kandidoz), kandidemi ve çeşitli organların kandidozudur (Seyedmousavı ve ark 2015). Bağışıklığın baskılanması, diyabet, alkol kullanımı, uzun süreli kortikosteroid ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı başlıca risk faktörlerinin başında gelir (Pappas et al 2004). Herhangi bir dokuda İmmün savunmanın azalması *Candida* enfeksiyonunun ortaya çıkmasına neden olur (Aydın 2004). Bunun yanında yapılan çalmalarda özellikle B12 vitamin ve folik asit eksikliğinin *C. albicans* duyarlılığına neden olduğu gösterilmiştir (Bottero et al 1997). *C. albicans* konağa girmeden önce maya fazındadır, buna Y fazı (Yeast phase, saprofit faz) denir. Konak dokuya temas ettikten bir süre sonra ise psödemiçelyumlar geliştirerek hastalık oluşturan faza geçerler. Buna M fazı (Mycelial phase, hyphal phase) denir (Aydın 2004).

Laboratuvar tanısında, kanlı agar, Eosin Metilen Blue agar, MacConkey agar gibi rutin kullanılan besiyerleri kullanılır. Kandidalar bu besiyerlerinde 1-2 günde üreyebilmektedirler. Maya kolonileri kültür plaklarında beyaz opak renkte ve nemli bir görüntü oluşturur. Kendine özgü kokuları vardır. Klinik örneklerden *Candida* şzasyonunda Sabouraud dekstroz agar (SDA) da tercih edilebilir (Koçoğlu 2013). *C. albicans* glukoz, galaktoz ve maltozu fermente edebilirken laktoz, rafinoz, mellibiyoz ve melisitozu fermente edemez. Glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz trehaloz, D-ksiloz, ve D-mannit'i asimile ederken laktozu rafinozu ve sellobiyozu

asimile edemez. Sukrozdan gaz oluşumu göstermez. Sikloheksidine duyarlıdır. *C. albicans*'ın germ tüp deneyinin pozitif olması onu diğer kandidalardan ayıran en belirgin özelliğidir (Aydın 2004).



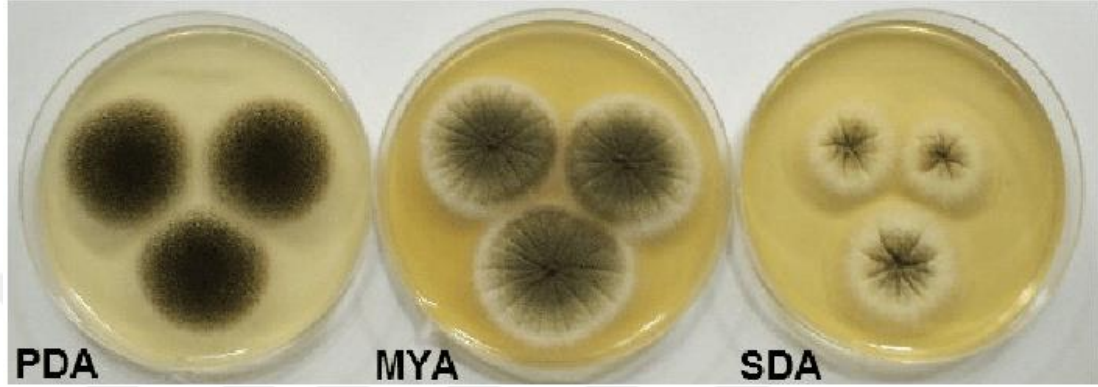
Resim 8: *C. albicans* SDA (Sabouraud Dextrose Agar) katı besiyerindeki koloni görünümü (Sharma, Sudharshan, Therese, Agarwal and Biswas 2016).

2.7.7. *Aspergillus brasiliensis*

Aspergillus'lar dünya üzerinde yaygın olarak bulunan hifli mantar türleridir. Doğal yaşam yerleri toprak ve çürüyen bitki materyalleridir. Doğadaki karbon ve nitrojen döngüsünde görev alırlar. Ürettikleri hücre dışına salgılanan enzimler sayesinde organik maddeleri ayrıştır ve besin olarak kullanırlar (saprofit yaşam). Uygun koşullar oluştuğunda bitki, hayvan ve insanlarda patojenite gösterebilirler. Üreme hızları yüksektir. Eşaysız üremeyi sağlayan sporları atmosfere dağıtarak havada asılı kalabilir, toz ve diğer parçacıklarla her yere taşınabilirler. Havada en yüksek oranda bulunan mantarlardan biridir. Ortam çalışmalarında insanların solunumla günde en az birkaç yüz spor aldıkları belirlenmiştir (Chazalet et al 1998, Hosphental, Kwon-Chung, Bennett 1998).

A. brasiliensis enfeksiyonlarına karşı riskli gruplar; Nötropeni görülen ve kemik iliği nakli olmuş hastalardır (Allam ve ark 2002, Muller ve ark 2002). Oluşturdukları hastalığın şiddeti bakterinin virülans faktörlerine göre değişkenlik gösterir. En önemli virülans faktörleri sıcaklık toleransı, dimorfizm, kapsül / hücre duvarı ve ürettikleri enzimlerdir. Bu faktörler etkenin konak hücreye tutunmasını ve kolonizasyonunu sağlar. Ayrıca konak hücrenin savunma mekanizmasını inhibe eder (Ghannohum

1995, Kantaroğlu ve Yücel 2003). Aspergillusların neden oldukları hastalıklar arasında akciğer enfeksiyonu, sinüzit, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, endokardit, perikardit, miyokardit, deri enfeksiyonları, kemik enfeksiyonları, göz enfeksiyonları ve kulak enfeksiyonları, alerjik sinüzit, aspergillom, otomikoz sayılabilir. (Ayberkin ve ark 2009).



Resim 9: B. aspergillus potato dextrose agar (PDA), malt yeast agar (MYA) ve Sabouraud dextrose agar (SDA) üzerinde koloni görüntüleri

. (https://www.researchgate.net/figure/Cultural-characteristics-of-Aspergillus-niger-grown-on-potato-dextrose-agar-PDA-malt_fig1_49655095 Erişim tarihi: 20.04.019)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

- Otoklav (Nüve, Turkey)
- İnkübatör (Nüve, Turkey)
- pH Metre
- Su Banyosu (memmert)
- gırır Kabini (biyogüvenlik) (holten)
- Dijital Kumpas
- Mikropipet (1000 µl)
- Mikropipet (100 µl)
- Mikropipet Ucu (Kirgen)
- Kuru Hava Sterilizatörü (Fırın) (Elektromag)
- Mezür (isolab)
- Kaba Terazı (dikomsan)
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Benchmark)
- Manyetik Balık
- Vortex (heidolph reax top)
- Çelik pens (S&H Labware)
- 1 lt kapaklı cam şişe (S&H Labware)
- 13 x 100 mm cam tüp (isolab)
- 7,5 x 75 mm cam tüp (isolab)
- 160 x 120 mm cam tüp (isolab)
- Pamuk
- Steril Eküvyon Çubuğu (LP Italiana)
- Tüp Standı
- Petri Kutusu (Fıratmed, 90 mm)
- Whatman Kağıdı 1,6 ml (Filterlab)
- Alüminyum Folyo

3.2. KİMYASALLAR / REAKTİFLER

- Mueller Hinton Broth (BD)
- Mueller Hinton Agar (BD)
- Sabouraud Dextrose Agar (BD)
- Sabouraud Dextrose Broth (BD)
- Distile Su
- %0,9 Serum Fizyolojik (Distile Su + Sodyum klorid) (MERCK)
- McFarland Standardı (GBL)
- Tween 20 (Merck)
- Çay Ağacı Yağı (Toroslar®)
- Portakal Yağı (Toroslar®)

3.3. MİKROORGANİZMALAR

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (KwikStik)
- *Escherichia coli* ATCC 8739 (KwikStik)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 2312 (KwikStik)
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (KwikStik)
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14048 (KwikStik)
- *Candida albicans* ATCC 26790 (KwikStik)
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (KwikStik)

3.4. YÖNTEMLER

3.4.1. Hazırlık Aşaması

3.4.1.1. Mueller Hinton Broth (MHB) Hazırlanması

Muller Hilton sıvı besi yeri hazırlanabilmesi için 22 g toz besiyeri kaba terazide tartıldı. Mezür ile 1 lt distile su ölçüldü. Tartılan besiyeri 1 lt şişe içerisine aktarıldı. Üzerine ölçülmüş olan distile su eklendi. Şişe içerisine manyetik balık atıldı ve kapağı

kapatılarak çalkalandı. Şişe 50°C'ye ayarlanmış olan ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine koyuldu ve homojen karışım sağlanana kadar bekletildi. Homojen karışım oluştuktan sonra otoklava koyuldu ve 1 atm basınç altında 121°C'de 15 dakika sıvı programda steril edildi. Steril olan besiyeri otoklavdan alınarak 25°C 'ye ayarlanmış olan su banyosunda soğuması için bekletildi. Böylece Müller Hilton broth hazırlanmış oldu. Soğuyan besiyeri laf kabini altına alındı ve pH ölçümü için numune alındı. pH metre ile ölçüm yapıldı ($7,3 \pm 0,1$). pH değeri uygun aralıklarda bulunan besiyerinden 10 ml numune alınarak sterilite kontrolü için 35-37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.4.1.2. Mueller Hilton Agar (MHA) Hazırlanması

Müller Hilton Agar hazırlanabilmesi için 38 g toz besiyeri kaba terazide tartıldı. Mezür ile 1 lt distile su ölçüldü. Tartılan besiyeri 1 lt şişe içerisine aktarıldı ve üzerine ölçülmüş olan distile su eklendi. Şişe içerisine manyetik balık atıldı ve şişenin kapağı kapatılarak çalkalandı. Hazırlanan karışım 50°C'ye ayarlanmış olan ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine koyuldu ve homojen karışım sağlanana kadar bekletildi. Homojen karışım oluştuktan sonra şişe otoklava koyuldu ve 1 atm basınç altında 121°C'de 15 dakika sıvı programda steril edildi. İşlem sonrası besiyeri otoklavdan alınarak 50°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda soğuması için bekletildi. Böylece Muller Hilton Agar hazırlanmış oldu. Soğuyan besiyeri laf kabini altına alındı ve pH ölçümü için numune alındı. pH metre ile ölçüm yapıldı. ($7,3 \pm 0,2$). pH değeri uygun aralıklarda bulunan besiyeri steril petrilere 25 ml olacak şekilde döküldü ve agarın donması için beklendi. Bir petri sterilite kontrolü için 35-37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.4.1.3. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Hazırlanması

Toz besiyeri kaba terazide tartıldı. Mezür ile 1 lt distile su ölçüldü. Tartılan besiyeri 1 lt şişe içerisine aktarıldı ve üzerine ölçülmüş olan distile su eklendi. Şişe içerisine manyetik balık atıldı. Şişenin kapağı kapatılarak çalkalandı. Şişe 50°C'ye ayarlanmış olan ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine koyuldu ve homojen karışım sağlanana kadar bekletildi. Homojen karışım oluştuktan sonra şişe otoklava koyuldu ve 1 atm basınç altında 121°C'de 15 dakika sıvı programda steril edildi. Steril olan besiyeri otoklavdan alınarak 50°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda soğuması için bekletildi. Soğuyan besiyeri laf kabini altına alındı ve ph ölçümü için numune alındı, pH metre ile ölçüm yapıldı. ($5,6 \pm 0,2$) pH değeri uygun aralıklarda bulunan besiyeri steril petrilere 25 ml

olacak şekilde döküldü ve agarın donması için beklendi. Bir petri sterilite kontrolü için 22-24°C’de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.1.4. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) Hazırlanması

65g toz besiyeri kaba terazide tartıldı. Mezür ile 1 lt distile su ölçüldü. Tartılan besiyeri 1 lt şişe içerisine aktarıldı ve üzerine ölçülmüş olan distile su eklendi. Şişe içerisine manyetik balık atıldı. Şişenin kapağı kapatılarak çalkalandı. Şişe 50°C ‘ye ayarlanmış olan ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine koyuldu ve homojen karışım sağlanana kadar bekletildi. Homojen karışım oluştuktan sonra şişe otoklava koyuldu ve 121°C’de 15 dakika sıvı programda steril edildi. Steril olan besiyeri otoklavdan alınarak 25°C ‘ye ayarlanmış olan su banyosunda soğuması için bekletildi. Soğuyan besiyeri laf kabini altına alındı ve pH ölçümü için numune alındı. pH metre ile ölçüm yapıldı. (5,6 ± 0,2) pH değeri uygun aralıklarda bulunan besiyerinden 10 ml numune alınarak sterilite kontrolü için 22-24°C’de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.1.5. %0,9 Serum Fizyolojik Hazırlanması

9g Sodyum Klorid tartıldı. Mezür ile 1 lt distile su ölçüldü. 1 lt kapaklı cam şişe içerisinde tartılan sodyum klorid ve ölçülen distile su karıştırıldı. Homojen karışım olana kadar çalkalandı. Homojen karışım oluştuktan sonra şişe otoklava koyuldu ve 1 atm basınç altında 121°C’de 15 dakika sıvı programda steril edildi.

3.4.1.6. 0,5 Mcfarland Standartında Mikroorganizma Hazırlanması

Bakteriler için 100 ml MHB, Küf- Mantarlar için 100 ml SDB besiyeri içerisine kwikstik ATCC suşları eklendi. Bakteriler 35-37°C’de, mantarlar 22-24°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 160 x 120 mm cam tüpler alüminyum folyo ile sarılarak 1 atm basınç altında 180°C’ye ayarlanmış olan kuru hava sterilizatöründe 2 saat steril edildi. Steril olan tüpler Laminar air flow (LAF) kabini altında tüp stantlarına koyularak soğuması beklendi. 24 saat sonunda inkübasyondan alınan mikroorganizmalar LAF kabini altına getirildi. Tüplerin üzerine mikroorganizmaların isimleri yazıldı ve isimlendirilmiş tüplere her bir sıvı besiyerinden 2 ml aktarıldı. McFarland No: 0,5 Standart solüsyon tüpü ile besiyeri içeren tüpler yan yana alındı. Bulanıklıkları eşit olana kadar besiyeri üzerine serum fizyolojik eklendi ve vortex ile karıştırıldı. Solüsyonlar 15-20 dakika 35-37°C’de inkübe edildi.

3.4.1.7. Tween 20 Hazırlanması

Hazır olarak alınmıştır. Esansiyel yağları seyreltme amacı ile çözücü olarak kullanılmıştır.

3.4.1.8. Kağıt Disk (Filtre Kağıdı) Hazırlanması

Filterlab whatman kağıdı delgeç ile delinerek kağıt diskler elde edilmiştir. Bu diskler cam petri kabı içerisine alındı ve alüminyum folyo ile sarılarak 1 atm basınç altında 180°C'ye ayarlanmış olan kuru hava sterilizatöründe 2 saat steril edildi.

3.4.1.9. Esansiyel Yağların Dilisyonlarının Hazırlanması

Bitki esansiyel yağları ticari olarak satın alınmıştır. Portakal yağı, çay ağacı yağı ve portakal- çay ağacı yağı kombinasyonu için ayrı ayrı %10-100 arası dilisyon hazırlanmıştır. 7,5 x 75 mm cam tüpler alüminyum folyo ile sarılarak 1 atm basınç altında 180°C'ye ayarlanmış olan kuru hava sterilizatöründe 2 saat steril edildi. Steril edilen tüpler LAF kabini altına getirildi ve tüp standlarına koyuldu. Her bir tüpün üzerine yağ ismi ve dilisyon oranı %10'dan başlayarak artacak şekilde yazılarak isimlendirildi. İsimlendirilen tüplere %100 dilisyondan başlayarak sırası ile 1 ml, 0,9 ml, 0,8 ml, 0,7 ml, 0,6ml, 0,5 ml, 0,4ml, 0,3 ml, 0,2 ml ve 0,1 ml esansiyel yağlardan koyuldu. Daha sonra yağ koyulmuş olan tüplere yine %90 dilisyondan başlayarak sırası ile 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml olarak tween 20 eklendi. Ve son olarak tüpler vortexlendi.

3.4.1.10. Antibiyotik Disklerinin Hazırlanması

Antibiyotik disklerinin hazırlanabilmesi için The Clinical & Laboratory Standars Institue (CLSI) kılavuzundan yararlanılarak antibiyotik hammaddeleri seçildi. Oluşturulacak antibiyotik disklere emdirilecek konsantrasyonlar ticari olarak satılan standart antibiyotik disklerindeki miktarlara göre hazırlandı. Steril edilen filtre kağıdına hazırlanmış olan antibiyotik solüsyonundan 5 µl emdirildi. Kullanılan antibiyotik ham maddeler ve miktarları ile kullanılan çözücüler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Kontrol Grubu Antibiyotiklerin Hazırlanması

Antibiyotik	Çözücü	Tartılan Miktar
Neomisin	Su	0,0348 mg
Gentamisin	Su	0,0312 mg
Streptomisin	Su	0,0250 mg
Kanamisin	Su	0,0360 mg
Amoxisillin	Su	0,0100 mg
Amoxisilli Klavunalik Asit	Fosfat Tampon	0,0200 mg
Tetracycline	Su	0,0300 mg
Doxycycline	Su	0,0300 mg

3.4.2. Uygulama Aşaması

3.4.2.1. Disk Difüzyon Testi Uygulaması

Her bir bakteri türü için MHA içeren 5 petri ayarlandı. Donmuş olan MHA petrilerinin arka kısmı cam kalemi ile çizilerek ikiye ayrıldı. Ayrılmış olan bölümlere sıra ile %10-100 e kadar oranlar yazıldı. Petrilerin üst kapağına esansiyel yağın ismi ve bakterinin ismi yazıldı. 0,5 McFarland standardına ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan steril pamuklu eküvyon çubuğuyla alınarak agarın tüm yüzeyine sürüldü. Petriler oda sıcaklığında kuruması için yaklaşık 15 dakika beklendi. Steril boş petri kapağı içerisine steril edilmiş olan çelik pens ile Whatman kağıtları koyuldu. Tek kat olacak şekilde koyulmuş olan kağıt diskler üzerine dilüe edilmiş yağ süspansiyonlarından 0,01 ml emdirildi. Yağ emdirilmiş kağıt diskler pens yardımı ile alınarak isimlendirilen petri bölümlerine dikkatlice bırakıldı. Her bir işlem öncesinde pens ucu bek alevi ile steril edildi. Disk yerleştirilmiş olan petriler 35-37°C'ye ayarlanmış olan inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Bu işlemler Portakal yağı, çay ağacı yağı ve bu iki yağ kombinasyonu için ayrı ayrı uygulandı. İnkübasyon sonrasında kağıt disklerin etrafında oluşan şeffaf

zon kısmı dijital kumpas yardımı ile ölçüldü. Ölçülen değerlerin oranları, RSD değeri (veya sapma değeri) hesapları yapıldı. Ölçüm sonuçları karşılaştırılıp yorumlandı.

3.4.2.2. Yayma Plak Testi Uygulaması

Her bir mantar için SDA içeren 10 petri ayarlandı. Petrilerin üzerine yağın ismi, mikroorganizma ismi ve dilüsyon oranı yazıldı. 0,5 McFarland standardına ayarlanmış olan mikroorganizma süspansiyonundan steril pamuklu eküvyon çubuğu batırıldı. Pamuklu uç tüpün kenarına sürülerek çıkarıldı ve agarın tüm yüzeyine sürüldü. Petriler oda sıcaklığında ksabitlenmesi için (yaklaşık 15 dakika) beklendi. Kuruyan agarların üzerine, eküvyon çuğu ile esansiyel yağların dilisyonlarından sürüldü. Petriler 22-24°C’de inkübe edildi. Üreme olana kadar takibi yapıldı. Üremenin başladığı gün not edildi.

3.4.2.3. Sıvı Besiyeri Makrodilasyon Testi Uygulaması (MİK) Hesaplanması

13 x 100 mm cam tüpler alüminyum folyo ile sarılarak 1 atm basınç altında 180°C’ye ayarlanmış olan kuru hava sterilizatöründe 2 saat steril edildi. Steril olan tüpler laf kabini altına getirildi ve tüp standına yerleştirilerek soğuması beklendi. Her bakteri için 7 tüp hazırlandı. Her tüpe sırası ile 1-7 arası numara verildi. Tüplerin üzerine bakteri ismi, yağ ismi ve tüp numarası yazıldı. Her tüpe 1 ml MHB koyuldu. Birinci tüpe 1 ml esansiyel yağ koyularak pipetaj yapıldı. Birinci tüpten 1ml solüsyon alındı ve 2. Tüpe aktarıldı ve pipetaj yapıldı. Bu şekilde altıncı tüpe kadar önceki tüpten birer ml alınarak seyreltme işlemi yapıldı. En son altıncı tüpten 1 ml alınarak hacim sabit tutuldu. Dilisyonu hazırlanmış olan her tüpün içerisine 0,5 ml 0,5 McFarland standardına göre hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan eklenerek pipetaj yapıldı. MHB içeren yedinci tüpe pozitif kontrol olabilmesi için esansiyel yağ koyulmadı. Her işlem basamağında pipet ucu değiştirildi. Her bir yağ için 1 ml MHB ve 1 ml esansiyel yağ içeren bir tüp negatif kontrol hazırlandı. Tüpler pamuk ile kapatılarak tüpler 35-37°C’de 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında aralıklarla yağ çökmesine karşı tüpler hafifçe çalkalandı. İnkübasyon sonunda tüplerin her birinden 50 µl alındı ve ikiye bölünmüş olan MHA petrilerinin bölmelerine ekildi. Petriler 35-37°C’de 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında petrilerde görülen üreme miktarları gözlemlendi ve kontrol için çalışma 2 kez tekrarlandı.

3.4.2.4. Agar Difüzyon Testi Değerlendirmesi

İnkübasyon sonrasında kağıt disklerin etrafında oluşan Şeffaf zon bölümleri dijital kumpas ile ölçüldü. Ölçülen değerlerin oranları, RSD değeri (veya sapma değeri) hesapları yapıldı. Ölçüm sonuçları yorumlandı.

3.4.2.5. Yayma Plak Testi Değerlendirmesi

10 gün süre ile üreme takibi yapıldı. Üremenin başladığı gün kaydedildi.

3.4.2.6. Sıvı Besiyeri MİK Bulguları Değerlendirmesi (Makrodilisyon)

İnkübasyon sonunda tüplerin her birinden 50 µl alındı ve ikiye bölünmüş olan MHA, petrilerinin bölmelerine ekildi. Petriler 35-37°C’de 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında petrilerde görülen üreme miktarları gözlemlendi ve kontrol için çalışma 2 kez tekrarlandı.

4. BULGULAR

4.1. ESANSİYEL YAĞLARIN DİSK DİFÜZYON TESTİ BULGULARI

Çalışmamızda çay ağacı yağı, portakal yağı ve bu iki yağ kombinasyonunun farklı dilüsyonlarının *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkisi disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. Kullanılan yağların farklı dilüsyon değerlerinde oluşturduğu inhibisyon zon bulguları aşağıdaki tabolalarda verilmiştir.

Çay ağacı yağı tablo 3'te verilen verilere göre *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde %50 ve üzeri, *S. typhimurium*'da tüm dilüsyonlarında inhibisyon zonu oluşturmuştur. *B. subtilis* ise 3 dilüsyon hariç hepsinde etki gözlenmiştir.

Tablo 4: Çay Ağacı Esansiyel Yağının Farklı Dilüsyonlarının Antibakteriyel Etki Sonuçları

Yağ Dilüsyon Oranları (%)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. typhimurium</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)	<i>B. subtilis</i> (mm)
100	16,41	11,86	11,00	8,07
90	10,92	10,68	10,10	6,04
80	9,86	8,70	10,50	7,31
70	10,00	8,63	9,80	8,16
60	9,45	9,80	8,06	-
50	8,17	7,80	7,95	9,10
40	-	6,60	-	-
30	-	9,90	-	-
20	-	11,28	-	7,86
10	-	11,20	-	8,67

- : Zon oluşumu yok

Portakal esansiyel yağı sadece *S. typhimurium* ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel antibakteriyel etki göstermiş ve tüm dilüsyonlarına inhibisyon zonu tesbit edilmiştir.

Tablo 5: Portakal Esansiyel Yağının Farklı Dilisyonlarının Antibakteriyel Etki Sonuçları

Yağ Dilisyon Oranları (%)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. typhimurium</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>B. subtilis</i> (mm)
100	-	-	-	15,50	-
90	-	9,30	-	12,50	-
80	-	8,90	-	13,20	-
70	-	8,80	-	13,10	-
60	-	9,60	-	13,00	-
50	-	8,90	-	10,00	-
40	-	9,50	-	9,40	-
30	-	10,10	-	11,00	-
20	-	11,20	-	11,50	-
10	-	10,53	-	10,40	-

- : Zon oluşumu yok

Portakal ve çay ağacı yağı kombinasyonu disk difüzyon testi sonuçlarında *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal zon oluşumu gözlemlenmiştir. Fakat *P. aeruginosa* da diğer çalışılan bakteriler göre daha az bir etkinin olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 6: Çay Ağacı ve Portakal Esansiyel Yağı Kombinasyonunun Farklı Dilisyonlarının Antibakteriyel Etki Sonuçları

Yağ Dilisyon Oranları (%)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. typhimurium</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
100	8,12	7,51	5,95	9,55
90	8,35	8,24	5,90	9,58
80	6,20	7,14	-	10,30
70	6,70	7,30	-	12,04
60	6,30	7,25	-	14,00
50	8,30	8,61	-	14,50
40	6,40	8,30	-	14,40
30	5,70	10,23	-	14,10
20	-	10,75	-	14,70
10	-	9,26	-	16,26

- : Zon oluşumu yok

4.2. ESANSİYEL YAĞLARIN MİK BULGULARI

Esansiyel yağların hangi konsantrasyonda etki göstermeye başladığını daha iyi gözlemleyebilmek için sıvı besiyerine bakteri ekimi yapılarak minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir. Aşağıdaki tablolarda esansiyel yağların her bir bakteri üzerinde etkili olduğu MİK değerleri gösterilmiştir. Yapılan çalışmada negatif kontrol tüplerinde herhangi bir üreme gözlemlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak her bakteri için ayrı ayrı çalışılan test tüplerinin hepsinde üreme gözlemlenmiştir. Çay ağacı esansiyel yağı MİK değeri için hazırlanan yoğunluklar ve bakteriler ve yağın bakteri üremesine etki sonuçları tablo 6' da gösterilmiştir. Çay ağacı esansiyel yağı çalışılan tüm bakterilerin üremesini belirlenen yoğunlukta inhibe etmiştir. Bu yüzden çay ağacı esansiyel yağının MİK değeri tüm bakterilerde, en düşük konsantrasyon değeri olan % 0,78 olarak belirlenmiştir.

Tablo 7: Çay Ağacı Esansiyel Yağının Test Edilen Bakteriler Üzerinde MİK Sonuçları

Yağ Konsantrasyon Oranları (%)	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Mikroorganizmalar			
			<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
25	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
12,5	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
6,250	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
3,125	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
1,562	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
0,78	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO

ÜG: Üreme Görüldü

ÜO: Üreme Olmadı

Portakal yağının sıvı besiyeride farklı konsantrasyonlar arasındaki bakteri üreme inhibisyon etki sonuçları Tablo 7’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre portakal esansiyel yağı *E.coli* üremesini %25’lik konsantrasyonda inhibe edebilmiştir. %12,5 ve çalışılan daha düşük konsantrasyonlarda üreme inhibe edici etki göstermediği saptanmıştır. Dolayısıyla portakal esansiyel yağının *E.coli* üzerinde MİK değeri %25 olarak belirlenmiştir. Portakal yağının *S. typhimurium* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde hiçbir konsantrasyonda üreme inhibe edici etkiye rastlanmamıştır. Yağın *S. aureus* üzerindeki etkisine baktığımızda üreme inhibe edilgi en düşük konsantrasyon %1,562 olarak tespit edilmiştir. %0,8’lik konsantrasyonda portakal yağının üreme inhibe edici etkisinin ortadan kalktı ve bakteri üremesi olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 8: Portakal Esansiyel Yağının Test Edilen Bakteriler üzerinde MİK Sonuçları

Yağ Konsantrasyon Oranları (%)	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Mikroorganizmalar			
			<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
25	ÜG	ÜO	ÜO	ÜG	ÜG	ÜO
12,5	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
6,250	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
3,125	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
1,562	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
0,78	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG

ÜG: Üreme Görüldü

ÜO: Üreme Olmadı

Çay ağacı ve portakal esansiyel yağ kombinasyonunun farklı konsantrasyonlardaki üreme inhibe etkinliği değerleri Tablo 8’ de verilmiştir. Yağ kombinasyonunun *E. coli*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* üzerindeki MİK değeri üreme olmayan çalışılan en düşük konsantrasyon olan % 78 olarak tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* üzerindeki etkisine bakıldığında ise üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon %12,5 olarak tespit edilmiştir. % 6,250 ve diğer daha düşük yağ konsantrasyonlarında üreme görülmüştür. Bu yüzden çay ağacı ve portakal esansiyel yağ kombinasyonunun *P. aeruginosa* üzerindeki MİK değeri %12,5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca tüplerdeki yağ yoğunlukları azaldıkça bakteri koloni miktarının da arttığı gözlemlenmiştir.

Tablo 9: Çay Ağacı ve Portakal Esansiyel Kombinasyonunun Test Edilen Bakteriler üzerinde MİK Sonuçları

Yağ Konsantrasyon Oranları (%)	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Mikroorganizmalar			
			<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
25	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
12,5	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
6,250	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜG	ÜO
3,125	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜG	ÜO
1,562	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜG	ÜO
0,78	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜG	ÜO

ÜG: Üreme Görüldü

ÜO: Üreme Olmadı

4.3. ESANSİYEL YAĞLARIN YAYMA PLAK TESTİ BULGULARI

Çay ağacı yağı, portakal yağı ve bu iki yağ kombinasyonlarının *C. albicans* ve *A. brasiliensis* mantar türleri üzerine olan antifungal etkisi yayma plak yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışılan petripler her 24 saatte bir kontrol edilmiş, agar üzerinde mikroorganizma kolonisi olup oluşmadığı 10 gün süreyle takip edilmiştir. Aşağıdaki verilen Tablo 9, 10 ve 11’de gözlemlenen antifungal etki sonuçları yer almaktadır. İki mantar türü için de pozitif kontrol petrisi kullanılmış ve *C. albicans* mantar türünde ikinci günden itibaren, *A. brasiliensis*’de ise üçüncü günden itibaren üreme gerçekleştiği görülmüştür. Tablo 9’da verilen bilgiler doğrultusunda, görülmektedir. Çay ağacı yağının %10 ve %20’lik konsantrasyonlarında pozitif kontrolle aynı doğrultuda ikinci günden itibaren üreme görülmüştür. %30-70 arası konsantrasyon değerinde ise üçüncü günden itibaren üreme olduğu saptanmıştır. Yağın %90’lık konsantrasyonunda beşinci günden itibaren üreme olduğu, %100’lük konsantrasyonunda ise 10 günlük takip boyunca hiç mantar üremesi gözlenmediği tespit edilmiştir.

Çay ağacı yağının *A. brasiliensis* üzerindeki etkilerinin verildiği Tablo 9’daki bilgilere göre yağ konsantrasyonunun %10 ve %20 olduğu petriplerde ikinci günden itibaren, %30-

70 arası konsantrasyonlarında üçüncü günden %80-90'lık konsantrasyonlarında ise beşinci günden itibaren üreme olduğu saptanmıştır. %100'lük yağ konsantrasyonunda ise 10 gün boyunca takip edilmiş ve üreme saptanmamıştır.

Tablo 10: Çay Ağacı Esansiyel Yağının Farklı Konsantrasyonlarının *C. albicans* ve *A. brasiliensis* üzerinde Antifungal Etkileri

<i>C. albicans</i>											
Günler	Pozitif Kontrol	Esansiyel Yağ Konsantrasyonu (%)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
2.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
3.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
4.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
5.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
6.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
7.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
8.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
9.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
10.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO
<i>A. brasiliensis</i>											
Günler	Pozitif Kontrol	Esansiyel Yağ Konsantrasyonu (%)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
2.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
3.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
4.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
5.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
6.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
7.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
8.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
9.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
10.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO

ÜG: Üreme Görüldü

ÜO: Üreme Olmadı

Portakal yağının yayma plak antifungal etkinliği Tablo 10' verilmiştir. Verilen bilgiler doğrultusunda yağın tüm konsantrasyonlarında ikinci günden itibaren üreme gerçekleştiği gözlenmiştir. *A. brasiliensis* üzerindeki etkinliğinde ise pozitif kontrole aynı doğrultuda üçüncü günden itibaren üreme saptanmıştır.

Tablo 11: Portakal Esansiyel Yağının Farklı Konsantrasyonlarının *C. albicans* ve *A. brasiliensis* üzerinde Antifungal Etki Sonuçları

<i>C. albicans</i>											
Günler	Pozitif Kontrol	Esansiyel Yağ Konsantrasyonu (%)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
2.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
3.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
4.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
5.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
6.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
7.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
8.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
9.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
10.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
<i>A. brasiliensis</i>											
Günler	Pozitif Kontrol	Esansiyel Yağ Konsantrasyonu (%)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
2.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
3.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
4.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
5.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
6.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
7.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
8.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
9.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
10.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG

ÜG: Üreme Görüldü

ÜO: Üreme Olmadı

Çay ağacı yağı ve portakal yağı kombinasyonu *C. albicans* üzerindeki antifungal etkinlik çalışmaları sonucunda, bu yağ kombinasyonunun %10-50 arası konsantrasyonlarında pozitif kontrolle aynı doğrultuda ikinci günden itibaren, %60-100 arası konsantrasyonlarında ise beşinci günden itibaren üreme saptanmıştır. *A. brasiliensis* üzerindeki etkinliğinde ise %10-50 arasındaki konsantrasyonlarında pozitif kontrolle aynı doğrultuda üçüncü günden itibaren, %60-70'lik konsantrasyonda dördüncü günden, %80-100'lük konsantrasyonlarında ise beşinci günden itibaren üreme gözlenmiştir.

Tablo 12: Çay Ağacı ve Portakal Esansiyel Yağ Kombinasyonunun Farklı Konsantrasyonlarının C. albicans ve A. brasiliensis üzerinde Antifungal Etki Sonuçları

ÜG: Üreme Görüldü

ÜO: Üreme Olmadı

<i>C. albicans</i>											
Günler	Pozitif Kontrol	Esansiyel Yağ Konsantrasyonu (%)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
2.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
3.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
4.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
5.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
6.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
7.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
8.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
9.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
10.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
<i>A. brasiliensis</i>											
Günler	Pozitif Kontrol	Esansiyel Yağ Konsantrasyonu (%)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
2.	GG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
3.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO	ÜO
4.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
5.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
6.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
7.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
8.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
9.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG
10.	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG	ÜG

4.4. KONTROL GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN DİSK DİFÜZYON TESTİ BULGULARI

Yapılan çalışmada esansiyel yağların etkinlik derecesinin saptanması amacıyla, CLSI tarafından antibiyotik diskler olarak kullanılması tavsiye edilen bazı antibiyotikler disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiş ve karşılaştırmaları yapılmıştır. Tablo 12’ de kontrol grubu antibiyotiklerin etkinlik sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 13: Kontrol grubu antibiyotiklerin zon çapları

Antibiyotikler	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>
Gentamisin	25,89	23,53	21,17	26,84	18,10
Neomisin	23,33	16,43	26,51	23,00	13,20
Kanamisin	25,14	12,84	24,00	22,92	9,55
Streptomisin	21,41	21,40	20,80	16,00	8,17
Ampicillin	*	—	24,55	22,80	17,20
Amoxicillin klavulanik asit	*	—	20,70	26,69	14,52
Tetracycline	32,46	13,40	25,03	21,78	9,34
Doxycycline	33,24	09,50	23,30	22,40	—

*: Ölçülemeyecek kadar büyük zon çapı

_: Zon Çapı Görülmedi

ÇÖZÜCÜLERİN DİSK DİFÜZYON TESTİ BULGULARI

Esansiyel yağlarla yapılan çalışmalarda yağları seyreltmek amacı ile kullanılan çözücü tayininde tween 20'nin bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları Tablo 14'te gösterilmiştir. Disk difüzyon testi sonucunda tween 20'nin antibakteriyel etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlardan ötürü çalışmamızda çözücü olarak tween 20 tercih edilmiştir.

Tablo 14: Tween 20'nin disk difüzyon testi zon çapları

TWEEN 20					
%	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>
100	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda çay ağacı yağı (TTO), portakal yağı ve bu iki yağ kombinsyonunun çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği disk difüzyon, yayma plak ve MİK yöntemleri ile araştırılmıştır. Çalışmamızda gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olabilen *E. coli* (Özbaş ve Aytaç 1995, Kalkan ve Halkman 2006), hastane enfeksiyon etkeni ve çoklu antibiyotik direnci gösteren *P. aeruginosa* (Gül ve ark 2004), metsilin dirençli *S. aureus* (Rao, Shang, Hu, Rao 2016), salmonelloz etkeni *S. typhimurium* (Uluğ, Çelen, Ayaz 2009) bakterileri ile *C. albicans* ve *A. brasiliensis* mantar suşları üzerinde araştırma yapılmıştır. Başka çalışmalarda çay ağacı yağı doğal kaynaklı olmasından dolayı güvenli bir antiseptik olarak nitelendirilmiştir. Ayrıca son yıllarda birçok farmasötik ve kozmetik preparatta yer almaya başlamıştır. Çay ağacı üzerine yapılan çalışmalarda yağın çok düşük konsantrasyonlarda geniş bir mikroorganizma grubuna etkili olduğunu göstermiştir (Tezgül Çakır, Kaleağası ve Kökdil 2005). Bizim çalışmamızda Tablo 3'te verilen sonuçlara göre yapılan bu araştırmaları destekler niteliktedir. Yapılan disk difüzyon çalışmasında kullanılan bakterilerilerin çoğuna karşı çay ağacı yağı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. İnhibisyon zonunun 7 mm üzerinde olması yağın antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu göstermektedir (Prabuseenivasan, Jayakumar and Ignacimuthu 2006). Bu veriler doğrultusunda çay ağacı yağının antimikrobiyal ve anti fungal etkinliğe sahip olduğunu söyleyebiliriz. Çalışmamızda test edilen bazı mikroorganizmalar üzerinde %10'luk konsantrasyonlarda dahi yağın etkinliği gözlenmiştir. Bu da çay ağacı yağının düşük konsantrasyonlarda etkinliği olduğunu ve daha düşük maliyette antimikrobiyal ürünler elde etmeyi sağlayabileceğini düşündürmektedir. Yağın bu antimikrobiyal etkinliği hidrofobik terpen içeriğinden kaynaklanmaktadır. Hidrofobik terpen bakteri hücre zarı üzerinde lipit yıkıcı ve zar geçirgenliğini bozucu etkiye sahiptir (Cox 2001).

Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* ve *E. coli* üzerindeki çay ağacı yağının antibakteriyal etkinliğine baktığımızda zon oluşumları gözlenmiştir. Zhang ve ark yaptığı çalışmaya göre (2018), aynı yöntemle *E. coli* ve *P. aeruginosa* 'da belirgin derecede zon çapı oluştuğu görülmüştür. Bu da bizim

çalışmamızı desteklemektedir. Ayrıca çalışmamızda *S. typhimurium* üzerindeki çay ağacı yağı etkinliğine baktığımızda tablo 3'teki değerle göz önünde bulundurulduğunda yağın bazı düşük konsantrasyon değerlerinde yüksek konsantrasyon değerlerine göre daha yüksek zon çapları oluştuğu gözlemlenmektedir. Bu da çözücü olarak kullandığımız tween 20'nin yağı diffüze etme özelliğinin yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir. Literatür incelemesinde yağ dilüsyonu için çeşitli çözücüler kullanıldığı görülmüştür. Etanol (Souza et al 2018), metanol (Obidi et al 2013), aqueous dimethyl sulfoxide (DMSO) (Intorasoot et al 2017), tween 80 (Federman et al 2013) ve tween 20 (Topuz ve Madanlar 2011) bunlardan birkaçıdır.

Portakal yağının disk difüzyon testi sonuçlarında çalışılan bakterilerden sadece *S. aureus* ve *S. typhimurium* üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Obidi ve ark (2013) yaptığı çalışmada portakal yağı düşük konsantrasyonlarda dahi *E. coli* üzerinde disk difüzyon uygulamasında yüksek zon çapları tespit ederek yağın antimikrobiyal etkiliğini göstermiştir. Başka bir çalışmada da portakal suyu, portakal kabuğunun sulu ve etanollü ekstratlarının *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır (Baba, Mohammed, Ya'aba and Umaru 2018). Fakat bizim çalışmamız da bu bakteriler üzerinde etkinlik saptanmamıştır. Bunun nedeni olarak antimikrobiyal etki gösteren yağ içeriğinin, bitkinin hangi bölümünden elde edildiği (çiçek, yaprak gibi), bitki beslenmesi, gübreleme, bitkilerin yetiştirildiği bölgenin coğrafik konumu, iklimi, hasat mevsimi ve sonrası kurutma, depolama işlemleri gibi birçok faktöre bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterebileceği düşünülebilir. Bunların yanında elde edilme yöntemi de esansiyal yağın kimyasal bileşenlerini etkileyebilmektedir. (Alvarez-Castellanos and Pascual-Villalobos 2003). Sugeçti ve Koçer'in (2015) yaptığı çalışmada ise portakal yağının *E. coli* üzerinde düşük (7 mm) bir inhibisyon zonu oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada *P. aeruginosa* üzerinde portakal yağının hiçbir inhibisyon zonu oluşmadığı verilmiştir. Bu sonuçta bizim çalışmamızı destekler niteliktedirler. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda esansiyal yağın etki mekanizması çalışmalara göre farklılıklar gösterebileceği düşünülmektedir.

Portakal yağı ve çay ağacı yağının ayrı ayrı etkinliklerinin yanında ikisinin bir arada kullanıldığında antimikrobiyal etkinliği artırıyor olabileceğini düşünerek farklı konsantrasyonlarda etkinlik araştırması yapılmıştır. Bazı mikroorganizmalar üzerinde

farklı bir etkinlik oluşturmazken, *P. aeruginosa* üzerinde gözlenebilir bir etki oluşturmuştur. Çalışmamızda çay ağacı ve portakal yağı ayrı ayrı disk difüzyon metodunda *P. aeruginosa* üzerinde zon oluşturmamıştır. Fakat iki yağın karışımında bu bakteri üzerinde antimikrobiyal etki oluşumu gözlenmiştir. Bu yüzden bu iki yağ kombinasyonun bazı mikroorganizmalar üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olabileceğini düşünülmüştür. *P. aeruginosa* bunlardan biridir. Oluşan inhibisyon zonu %100'lük dilisyonunda 5,95 mm'dir. Bu değer 7 mm'nin altında kaldığından istatistiksel olarak çokta anlamlı bir değer olduğu söylenemez. Fakat ilerleyen çalışmalarda sinerjistik etki üzerinde çalışılabileceğini bizlere düşündürmüştür. Ayrıca portakal yağı disk difüzyon test sonuçlarında bazı dilisyonlarda *S. typhimurium* ve *S. aureus*'ta iki yağ kombinasyonuna göre daha yüksek zon çapları gözlenmiştir. İki yağın sinerjistik etkisinin olabileceğini düşünürken tam tersi antagonistik bir etki ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca bu sonuç yağların birlikte kullanıldığında tek başına kullanımlarına kıyasla konsantrasyon eksikliği oluşturmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bazı konsantrasyonlarda böyle bir etkinin görülmemesi yağların difüze olurken oluşabilecek sorunlardan da kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca portakal yağı disk difüzyon yönteminde *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki oluşturmazken çay ağacı yağı ile kombinasyonunda antimikrobiyal etki gözlenmiştir. Bu da çay ağacı yağının *E. coli*'de ki etkisinden kaynaklandığı yönünde olabileceğini düşündürmektedir.

Portakal yağının MİK değerlerine baktığımızda ise *S. aureus* üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu %1,562, *E. coli* üzerindeki %12,5'dir. *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* bakterilerinde MİK değeri saptanamamıştır. Birçok esansiyal yağ üzerinde yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus*'ta MİK değeri >12,8 bulunduğu belirtilmiştir (Prabuseenivasan, Jayakumar and Ignacimuthu 2006). *E. coli* de bulunan değerlerin çalışmamızda elde edilen bulgulara yakın olduğu görülmüştür. *P. aeruginosa*' da ise çalışmamızda MİK değeri saptanamazken onlar anlamlı rakamlar bulmuştur. Aynı sonuçları bulamamamızın birçok nedeni olabilir. Mesela portakal yağı ve tween 20 yoğun kıvamlı olduklarından yağ iyi difüze olmamış olabilir. Kullanılan yağın ticari markasından kaynaklanıyor olabilir. İlerleyen çalışmalarda portakal yağının halka sunulan farklı ticari markaları incelenerek, kullanan insanlara neler vaat ettiği ortaya konulabilir ve etkinlik dereceleri

kıyaslanabilir. Hatta bu ticari yağların bitkinin hangi kısmından elde edildikleri araştırılarak çalışmalara yeni bakış açıları getirilebilir.

Doğal ve çevre dostu antibiyotikler, antioksidanlar, ilaç endüstrisi için öncelikli araştırma haline gelmiştir. Portakal yağı hakkında literatürde antimikrobiyal etkinliğe dair birçok bakteri üzerine antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır (Obidi et al 2013). fakat bizim çalışmamızda yapılan disk difüzyon yöntemide portakal yağı sadece *S. aureus* ve *S. typhimurium* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Bu da hastane enfesiyon etkenleri arasında sayılan ve metisiline karşı direnç gösteren *S. aureus* üremesini durdurucu olmasından ötürü büyük bir öneme sahiptir. Tüm dünyada büyük bir sorun teşkil eden antibiyotik direncine karşı portakal yağı bir alternatif çözüm olabilir. Yağın antimikrobiyal özellikte olmasının nedenlerinden biride içerikte bulunan limonen maddesidir. Limonen antimikrobiyal ve antiseptik özelliği yüksek bir maddedir (Magwa et al 2006). Federman ve ark. (2013) yaptığı çalışmada, portakal yağı içeriklerinden olan hem linalool hem de sitratin *S. aureus* üremesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca bu içeriklerin biyofilm oluşumunu engellediğide belirtmişlerdir. Sadece % 0,12 MİK değerindeki linalolün *S. aureus* biyofilm oluşturucu genleri baskıladığını tespit etmişlerdir. Bu da yıllık yüksek maliyetleri olan enfeksiyon hastalıkları tedavilerinde toksik etki oluşturmayan ve daha ucuz maliyet sağlayan portakal yağının yeni bir bakış açısı oluşturabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda bu sonuçları destekler niteliktedir.

Makrodilasyon testi sonuçları çay ağacı yağı üzerinde yapılan antimikrobiyal etkinliğin yüksek olduğunu göstermiştir. *S. aureus* dahil çalışılan tüm bakteri türlerinin MİK değeri % 0,78 olarak tespit edilmiştir. Bu da çay ağacı yağının düşük konsantrasyonlarda dahi bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Çay ağacı-portakal yağı kombinasyonunun makrodilasyon testi sonucunda oluşturdukları etkiye bakıldığında *E. coli*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* üzerindeki MİK % 0,78, *P. aeruginosa* ise %12,5 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre yağ kombinasyonun *E. coli*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* üzerindeki inhibisyon etkinliği *P. aeruginosa*'da olan etkinlikten daha yüksek olduğu söylenebilir. Ulaşılan MİK değerleri disk difüzyon tesri sonuçlarını desteklemektedir. Bu sonuçlar sinerjistik etki üzerine çalışmaların artırılabilceğini düşündürmektedir.

Çay ağacı yağının antifungal etkinliğinde ise yayma plak yöntemi kullanılmış ve 10 gün üreme takibi yapılmıştır. *C. albicans* üzerinde İkinci gün sadece %10-20'lik konsantrasyonlarda üreme oluşmuştur. Üçüncü gün %40-70'lik konsantrasyonlarda beşinci gün ise %80-90'lukta üreme gözlenmiştir. %100'lük te ise hiç üreme gözlenmemiştir. Bu sonuçlar çay ağacı yağının candida üzerine yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu göstermiştir. Yağın yoğunluğu arttıkça etkinlik süresinde arttığı söylenebilmektedir. Bunun yanında yağın % 80-90'lık dilisyonlarında beş günden sonra üreme olmaya başlaması, yağın uçuculuğundan ötürü etkisinin giderek azalabileceğini düşündürmüştür. Çay ağacı yağının *A. brasiliensis* üzerindeki etkinliğide ise %60 ve üzeri konsantrasyonda antifungal etki saptanmıştır. Yağın %80-100'lük konsantrasyon aralığında ise 10 gün boyunca hiç üremenin olmaması da *A. brasiliensis* üzerinde yüksek antifungal etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Portakal yağının *C. albicans* ve *A. brasiliensis* üzerindeki etkisi çalışmamızda yayma plak testi ile araştırılmıştır. Fakat antifungal etkisinin olduğuna dair sonuçlar bulunamamış, pozitif kontrollerle birlikte aynı günde üreme olduğu kaydedilmiştir. Obidu ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada, portakal yağının metanollü dilisyonlarında *C. albicans* üzerinde farklı dilüsyon aralıklarında 30 ile 18 mm aradında inhibisyon zonu oluştuğu kaydedilmiştir. Ayrıca tek başına metanolün *C. albicans* üzerindeki etkisine de bakılmış ve sonuçta 6 mm inhibisyon zonu oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçta metanol kullanmadan bile portakal yağının *C. albicans* üzerinde etkinliğin olabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda bu çalışma ile aynı doğrultuda sonuç gözlenmemiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise 38 çeşit esansiyel yağın klinik izolatlardan elde edilen *C. albicans* üzerindeki antifungal etkileri incelenmiştir. Bu yağların etkinlik derecelerine göre yüksek derecede etkili, orta etkili, düşük etkili ve etkisiz olmak üzere sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada ulaşılan veriler doğrultusunda çay ağacı ve portakal yağı *C. albicans* üzerinde orta dereceli antimikrobiyal etkili sınıfa alınmıştır (Devkate, Zore and Karuppaiyil 2005). Bizim çalışmamızda aynı doğrultuda olmadığı söylenebilir. Ve yine bu sonuçların kullanılan portakal yağı içeriği ya da elde edildiği bitki bölümü ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

Gram negatif bakterilerin Gram pozitiflere göre esansiyel yağlara karşı daha dirençli olduğu düşünülmektedir (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, De Feo 2013). Bunun Gram negatiflerin daha karmaşık bir hücre duvarına sahip olmasından kaynaklanır. Bu kompleks yapı ilaçların, antibiyotiklerin ve esansiyel yağlarda bulunan fenolik bileşikler (Timol, carvacrol ve öjenol gibi) kolayca nüfuz etmesine izin vermez (Trombetta et al 2005, Tiwari 2009). Esansiyel yağlar, zar proteinlerinin hem geçirgenliğini hem de işlevini değiştirme özelliğine sahiptirler. Özellikle fenolikler bakımından zengin olan uçucu yağları, bakteri hücre duvarının fosfolipid tabakasına nüfuz edebilir, proteinlere bağlanabilir ve normal fonksiyonlarını bloke edebilirler. Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi, tek bir mekanizmaya değil, sitoplazma, enzim sistemi protein yapısı gibi çeşitli biyokimyasal ve yapısal fonksiyonları etkileyen mekanizmalara sahiptir (Sakkas et al 2016). Bizde çalışmamızda kullanılan bakterilerinde Gram pozitif ve Gram negatif olanların üzerinde kullandığımız esansiyel yağ etkinliklerinde, çay ağacı yağı hem gram pozitif hemde gram negatiflere etki ettiği görülmüştür. Ve disk difüzyon testinde oluşturduğu inhibisyon zon değerlerinin de birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin %100'lük dilisyonunda *P. aeruginosa* da 11 mm zon çapı oluşurken *B.subtilis* 'te aynı dilisyonunda 8,07 mm çapında inhibisyon zonu oluştuğu gözlenmiştir. Değerler birbirine çok yakındır. Portakal yağı ise çalışılan iki Gram pozitif bakteriden sadece *S. aureus*'ta, çalışılan dört Gram pozitif bakterien sadece *S. typhimurium* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Oluşan zon çaplarına baktığımızda *S. typhimurium*'da 11,86 mm, *S.aureus*'ta 15,50 mm zon çapı oluşmuştur. Bizim çalışmamızda Gram pozitif ve negatif bakteriler arasında çok anlamlı farklar gözlenmemiştir.

Çalışmamızda kullandığımız yağların antimikrobiyal etkilerinin kıyaslanabilmesi için bazı antibiyotiklerin kullandığımız mikroorganizmalar üzerindeki etkinliklerine disk difüzyon yöntemi ile bakılmıştır. Kullanılan tüm antibiyotiklerin *S. aureus*, *E. coli* ve *S. typhimurium* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları 20 mm ve üzerindedir. Çay ağacı yağının *E.coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu ise 16,41 mm olarak ölçülmüş ve portakal yağında ise hiçbir zon olumu gözlenmemiştir. Bu sonuçlarda bize çay ağacı yağının antibiyotikler kadar *E. coli* üzerinde inhibe edici etkisi olmadığını göstermiştir. Antibiyotikler kadar olmasa da antimikrobiyal etkinliğinin olması çay ağacı yağının gıda, tarım ve ilaç endüstrisinde serbestçe kullanılabilen potansiyel

doğal bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Zang et al 2018). *S. typhimurium* üzerinde iki yağında ayrı ayrı inhibiyon zon çapları 10 mm civarındadır. Neredeyse antibiyotiklerin etkisinden yarı yarıya daha az etki göstermektedirler. Yine de azımsanamayacak bir etkinliğe sahip olduklarını söyleyebiliriz.

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin *B. subtilis* üzerindeki antibakteriyal etkinliğine baktığımızda, Kanamisin'nin 9,55 mm, Tetracycline 9,34 mm, Streptomisin'nin 8,17 mm civarında inhibiyon zonları oluşturduğu görülmüştür. Çay ağacı yağı ise aynı bakteri üzerinde 8 mm civarında inhibiyon zonu oluşturmuştur. Bu sonuçta bu üç antibiyotiğin etkinlik değerlerine çay ağacı yağının inhibiyon etkinliğinin yakın olduğu görülmüştür. Dünya çapında giderek büyük bir sorun haline alan antibiyotik direncine karşı çay ağacı yağı gibi doğal antimikrobiyaller üzerine durulabileceğini ve bu yöndeki çalışmaların artırılabilceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda çözücü seçerken iki çözücü madde arasında tercih yapılmıştır. Bunlar etanol ve tween 20 idi. Tercih yapmak için bu iki çözücünün disk difüzyon yöntemi ile kullanacağımız mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırıldı. Elde ettiğimiz sonuçlarda etanolün belirgin bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Tween 20 de ise hiçbir zon oluşumu gözlenmemiştir. Çalışmamızda kullanacağımız yağların antimikrobiyal etkinliklerini net gözlemleyebilmek için çözücü olarak tween 20'i tercih edilmiştir. Yaptığımız bu test bize kullanılan çözücüye göre de yağların antimikrobiyal etkinliklerini değiştirebileceğini göstermiştir.

Bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak her yağın %100'den %10'a kadar tüm konsantrasyonu çalışmada kullanılan tüm mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir. Bu sayede esansiyel yağların düşük konsantrasyonlarda dahil istatistiksel olarak anlamlı etkinlik gösterebileceği ortaya konmuştur. Esansiyel yağlar toksik etkisinin olmaması, doğal kaynaklı olması, etkinlik derecelerinin yüksek olması, spazm çözücü, antiseptik ve antimikrobiyel özelliklerinin olması gibi birçok avantaja sahiptirler. Bazı çeşitleri ise, antimikrobiyel özelliklerinden ötürü gıda sanayinde kullanılan sentetik koruyucu maddelere alternatif olabilirler. Bizim çalışmamızda ise yağların düşük konsantrasyonlarda dahi kullanılarak maliyetleri düşürebileceği yönünde bulgular ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmamızda yağların kombinasyonlar

halinde kullanıldığında antimikrobiyal etkinlik derecesine bakılmıştır. İlerleyen çalışmalarda sinerjistik ya da antagonistik etki üzerinde durulabileceği düşünülmüştür. Yine çalışmamızda salmonelloz etkeni olan *S. typhimurium* üzerinde durulmuştur. Yapılan esansiyal çalışmalarına katkı olarak bu bakteri üzerinde de antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır. *B. subtilis*'de çalışmalarda pek kullanılmamıştır. Bizim çalışmamız da ise sterilizasyonda kontrol amaçlı kullanılan bu bakteri üzerinde esansiyal yağların etkisi ne kadar olmuştur bu gözlemlenmek istenmiştir. Sporlu bir bakteri olduğu için oldukça dirençli olmasına rağmen çalışmamızda antimikrobiyal etki saptanmış bu da ilerleyen çalışmalara ışık tutacağı yönünde bizleri düşündürmüştür. Diğer çalışmalardan farklı olarak *A. brasiliensis* mantar türünü tercih etmemizin sebebi ise havada sporlarının fazla olmasından ötürü bulaşımın kolay olmasından kaynaklanmaktadır. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları gibi önemli hastalık tabloları oluşturabilmektedirler. Çalışma sonuçlarında da *A. brasiliensis* üzerinde çay ağacı yağının antifungal etki oluşturması esansiyal yağ çalışmalarına yeni bakış açıları oluşturabileceğini düşündürmüştür. Bu sonuçlara ek olarak esansiyal yağların antimikrobiyal etkinliklerinin artırılması yönünde çalışmalar yapılabileceği de düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abalaka ME, Bello AO.(2006). Antibacterial Activity of Citrus sinensis (Orange) Peel on Bacterial Isolates from Wound. *UMYU J Microbial Res*, 1:1-8.

Al-Ani WN, Al-Haliem SM, Tawfik NO. (2010). Evaluation of the antibacterial activity of Citrus Juices: An In Vitro Study. *Al-Rafidain Dent J.*, 10: 376-382.

Allam MF, Del Castillo AS, Diaz-Molina C, Navajas RF. (2002). Invasive pulmonary aspergillosis: Identification of risk factors. *Scand J Infect Dis*, 34:819-22.

Alvarez-Castellanos PP, Pascual-Villalobos MJ. (2003). Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of Chrysanthemum coronarium (Asteraceae) cultivated in Spain. *Ind Crops Prod*, 17:77-81.

Anitha M, Hemapriya J, Mathivathani P, Ramya K, Monisha DM. (2016). A study on effectiveness of sweet orange against bacterial wound Isolates. *Intl J Plant Ani Eenvtal Sci*, 6:1-7.

Arslan S, Erginkaya Z, Özaslan M, Kılıç İH, Ünal E. (2013). Lactobacillus rhamnosus'un Sünme (Rope) Hastalığı etkeni olan Bacillus cinsi bakteriler üzerine İnhibitör etkisinin unlarda araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 43(4):155-164.

Aslım B, Sağlam N, Beyatlı Y. (2002). Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. *Turk J Biol*, 26 : 41-48.

Aydın M. (2004).Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji. Güneş Yayınevi, Ankara, s.1109.

- Aytaç SA, Mercanoğlu B, Özbaş ZY. (2001). Tampon çözeltide immunomanyetik ayırma ve atp biyoluminesans yöntemleri ile Escherichia coli 0157:H7 sayımı. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 58 (2) : 49 – 52.
- Baba J, Mohammed SB, Ya'aba Y, Umaru FI. (2018). Antibacterial activity of sweet orange citrus sinensis on some clinical bacteria species isolated from wounds. *J Family Med Community Health*, 5(4):1154.
- Bakkali F, Averback S, Averback D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essansial oils- A rewiew. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2):446-475.
- Bayaz M. (2014). Esansiyal yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antimitojenik aktiviteleri. *Academic food Journal*, 12(3):45-53.
- Bishop CD. Antimikrobial activity of the essansial oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essensial oil Research*, 7(6):641-644.
- Bottero A, Lauritano D, Spaari F, Zambellini Artini M, Salvato A. (1997). Atrophy of the oro-pharyngeal mucosa caused by vitamin B12 and folic acid deficiency. Etiopathologic aspects and clinicotherapeutic problems. *Minerva Stomatol*, 46: 359-74.
- Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemni I, Tounsi MS.(2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunican citrus during fruit maturation. *The Sci Wrld J*, 10 : 273-281.
- Caccioni DR, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Intl J Food Microbiol*, 43:73-79.

Carson CF and Riley TV. (1993). Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 16:49–55.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*, 19:50-62.

Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari, A. (2004). “Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma”. *J Invest Dermatol*, 122, 349-360.

Carson CF, Hammer KA, and Riley TV. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev*, 19,50–62.

Ceylan A. (1987). *Tıbbi Bitkiler II*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:481, s.1-22.

Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Vu Thien H, Gluckman E, Brücker G, Latgé JP. (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol*, 36: 1494-1500.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. (2001). Determining the antimicrobial actions of tea tree oil, 6: 87-9.

- Culos KA, Cannon JP, Grim SA. (2013). Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Ther*,20(2):200-12.
- Curtis MM, Sperandio V. (2011). A complex relationship: The interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. *Mucosal immunol*,4(2):133-8.
- Çelik E, Yuvalı Çelik G. (2007). Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2):1-6.
- Çetin R, Güven GB, Tunçbilek V, Develi S, Aykutluğ Ö, Korkmaz A. (2015). Mikroorganizmalar ve insan vücudu ile olan etkileşimleri Microorganisms and their interaction with human body. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 14(3):272-278.
- David MZ and Daum RS. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*, 23: 616–687.
- Devkate AN, Zore GB, Karuppayil MS. (2005). Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*, 5:867–873.
- Dettwiller P, Spelman T, Carson CF, Davey RC, Thomas J, Baby KE, Cooper GM, Kyle G, Naunton M, Hammer KA, Walton SF, Peterson GM.(2016). Therapeutic potential of tea tree oil for scabies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 94: 258–266.
- Dorman HJD, Deans SG. (2000). Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88:308-316.

- Duru ME. (1993). Liquidambar orientalis var. orientalis ve Liquidambar orientalis var. integriloba Yapraklarından Elde Edilen Uçucu Yağın Analizi. A.Ü. Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, (Prof. Dr. Mansur Harmandar)
- Eberl G. (2010). A new vision of immunity: Homeostasis of the superorganism. *Mucosal immunol*,3(5):450-60.
- Erdem B.(1999). Enterobacteriaceae içinde: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ustaçelebi Ş (Ed), Güneş Kitabevi, Ankara, 471- 515.
- Erol İ, İşer Ö (2004).Stafilokokal enterotoksinler Derleme / Review *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51: 239-245.
- European Pharmacopeia 9.2.- *Microbiological examination of herbal products and extracts*. (2.6.31).
- European Pharmacopeia 9.2.- *Microbiological Quality Of Non-Sterile Pharmaceutical Preparationsand Substances For Pharmaceutical Use*. Volume 01/2014:50104
- European Pharmacopeia 9.2- Microbiological Examination Of Non-Sterile Products: *Test For Specified Micro-Organisms*. Volume 04/2010:20613
- European Pharmacopeia 9.2- *Microbiological Examination Of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests*. Volume 07/2010:20612.
- Evren M, Tekgüler B.(2011). Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. *Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(3):28-40.
- Federman C, Ma C,Biswas D. (2016). Major components of orange oil inhibit Staphylococcus aureus growth and biofilm formation, and alter its virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*, 65: 688–695.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS.(2007). Bailey and Scotts' Diagnostic microbiology, 12nd ed., Chine.

García-García R, Lopez-Malo A, Palou E. (2011). Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *J Food Sci*, 76:95-100.

Galvão LC, Furletti VF, Bersan SM, da Cunha MG, Ruiz AL, de Carvalho JE, Sartoratto A, Rehder VL, Figueira GM, Teixeira Duarte MC, Ikegaki M, de Alencar SM, Rosalen PL. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evid Based Compl Altern Med;Article*, 2012:12.

Ghannoum MA, Edwards KE, Edwards JE Jr. (1995). Pathogenesis of fungal infections. *Baillière's Clinical Infectious Diseases*'de. *Ed.F.Meunier*, 2:1-16.

Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. (2004). Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-Test ve disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34: 33-36.

International Organisation for Standardisation. 2004. ISO 4730:2004. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland

Hamendra SP, Anand K.(2007). Anti-diaetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel in alloxatan treated male mice. *Bio Factors*, 31(1): 17-24.

- Hammer KA, Carson CF. (2011). Antibacterial and antifungal activities of essential oils in Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Thormar H (Ed.), John Wiley & Sons, Ltd, UK, s.255-306.
- Harris TO, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR. (1993). Lack of complete correlation between emetic and T-cell- stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun*, 61, 3175-3183.
- Hasija S, Ibrahim G, Wadia A .(2015). Antimicrobial Activity of Citrus Sinensis (Orange), Citrus Limetta (Sweet Lime) and Citrus Limon (Lemon) Peel Oil on Selected Food Borne Pathogens. *International Journal of Life Sciences Research*, 3(3) : 35-39.
- Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1998). Concentrations of airborne Aspergillus compared to the incidence of invazive aspergillosis: Lack of correlation. *Med Mycol*, 36: 165-168.
- Hayes AJ, Markovic B. (2003). Toxicity of Australian essential oil Backhousia citriodora (lemonmyrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. *Food Chem Toxicol*, 41:1409-16.
- Intorasoot A, Chornchoem P, Sookkhee S, Intorasoot S. (2017). Bactericidal activity of herbal volatile oil extracts against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(2):218-222.
- Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *Int J Infect Dis*, 14(4): 7-11.
- Kalkan S, Halkman K. (2006). Bacillus cereus ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(1):1-11.

Kantarcıoğlu AS, Yücel A. (1999). *Candida Albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. *Elektronik Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 30(3):236-246.

Kaynar P ve Beyatlı Y. (2006). Balıklardan İzole edilen Bacillus cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(3) :1-30.

Keskin D, Ekmekçi S. (2008). Pseudomonas aeruginosa'nın dirençli olduğu dezenfektanların saptanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1):27-32.

Keyvan E, Özdemir H. (2016). Sığır karkaslarında Staphylococcus aureus'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63:17-23.

Kılıç A.(2008). Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10 (13):37-45.

Kierman J. (2008). Histological and histochemical methods. In: Theory and practice 4nd ed., Oxfordshire Scion publishing Ltd.

Koçoğlu E. (2013). Mantarlar(Funguslar, dermatomikozlar,derin mantar enfeksiyonları). In: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul

Küçükçetin A, Milci S. (2008). Staphylococcus aureus ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda*, 33(3): 129-135.

Lee KW, Everts H, Beynen AC. (2004). Essential Oils in Broiler Nutrition. *International Journal of Poultry Science*, 3(12):738-752.

Lin G, Chen H, Zhou H, Zhou X and Xu H. (2018). Preparation of tea tree oil/poly(styrene-butyl methacrylate) microspheres with stained release and anti-bacterial properties. *Materials*, 11:710.

Linskens HF, Jackson JF(Eds), (1997).Essential Oils and waxes, Volume 12 Springer, Germany.

Liu K, Chen Q, Liu Y, Zhou X, Wang X. (2012). Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. *J Food Sci*, 77: C1156–C1161.

Malarkodi C, Rajeshkumar S, Paulkumar K, Gnanajobitha G, Vanaja M, Annadurai G. (2013). Bacterial synthesis of silver nanoparticles by using optimized biomass growth of *Bacillus* sp. *Nanoscience and Nanotechnology: An International Journal*, 3(2):26-32.

Magwa ML, Gundidza M and Gweru N. (2006). Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *sesuvium portulacastrum*. *J Ethnopharmacol*, 103: 85-89.

Messenger S, Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (2005). “Assessment of the antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276 and EN 12054 standard suspension tests”, *J Hosp Infect*, 59, 113-125.

Muller FM, Trusen A, Weig M. (2002). Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised children. *Eur J Pediatr*, 161: 563-74.

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6:1451-74.

Nannapaneni R, Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC, Johnson MG, O'Bryan, CA. (2009). Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions. *Int J Food Microbiol*, 129:43-49.

Obidi OF, Adelowotan AO, Ayoola GA, Johnson OO, Hassan MO, Nwachukwu SC U. (2013). Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *The International Journal of Biotechnology*, 2(6):113-122.

Otkun M, Erdem B, Akata F. (2001). Antibiotic resistance patterns and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* isolates in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 20(3): 206-9.

Özbaş ZY, Aytaç SA. (1995). *Escherichia coli* 0157:H7: Epidemiyolojisi, gıdalarla ilişkisi, patojenitesi ve izolasyon yöntemleri. *Türk Hij ve Den Biyol Derg*, 52: 47-53.

Özkuyumcu C (Ed). (2009). Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi -1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara.

Padhye NV and Doyle M P. (1992). *Escherichia coli* O157: H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*, 55:555- 565.

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismuke WE, Walsh TJ, Edwards JE. (2004). Infectious Diseases Society of America Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis*, 38:161-89.

- Piggot PJ and Hilbert DW. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**: 579-586.
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **6**:39.
- Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. (2016). *Staphylococcus aureus* ST121: A globally disseminated hypervirulent clone. *Journal of Medical Microbiology*, **64**: 1462–1473.
- Rieder BO. (2017). Consumer exposure to certain ingredients of cosmetic products: The case for tea tree oil. *Food Chem. Toxicol*, **108**, 326–338.
- Sakkas H, Gousia P, Economou V, Sakkas V, Petsios S, Papadopoulou C. (2016). In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *J Intercult Ethnopharmacol*, **5**(3):212:218.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB.(2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, **90**(3):859-904.
- Seyedmousavı S, İlkit M, Durdu M, Ergin Ç, Hilmioğlu Polat S, Melchers W, Verweij P. (2015). *Candida* ve *Kandidoz*: epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*,**45**(1):1-11.
- SharifiRad J, Salehi B, Varoni EM, Sharopov F, Yousaf Z, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Sharifi-Rad M, Afdjei MH, Sharifi-Rad M, Iriti M. (2017). Plants of the

Melaleuca genus as antimicrobial agents: From farm to pharmacy. *Phytother. Res.*, 31:1475–1494.

Sharma H, Sudharshan S, Therese L, Agarwal M and Biswas J. (2016). *Candida albicans* scleral abscess in HIV-positive patient and its successful resolution with antifungal therapy-a first case report. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 6:24.

Souza CF, Lima T, Baldissera MD, Geihs MA, Maciel FE, Nery LEM, Santos RCV, Raffin RP, Heinzmann BM, Caron BO and Baldisserotto B. (2018). Nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil exerts anesthetic effects in the brachyuran crab using *Neohelice granulata*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Annals of the Brazilian Academy of Sciences)*, 90(3): 2855-2864.

Şen A, Halkman AK. (2006). Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 04 (02) : 2-13.

Şengezer E, Güngör T.(2008). Esansiyel yağların hayvanlar üzerindeki etkileri. *Lalahan Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 48(2): 101-110.

Tezgül Çakır N, Kaleağası S, Kökdil G.(2005). Tea tree oil: as a promising antimicrobial agent/ Umut vaat eden bir antimikrobiyal: tea tree oil (çay ağacı yağı). *Ankara Ecz. Fak. Derg*, 34 (4):315-32.

Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem*, 57:5987-6000.

- Topuz E, Madanlar N.(2011). Bazı bitkisel kökenli uçucu yağların *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867) (Acari: Tetranychidae) üzerine kontakt ve repellent etkileri. *Türk. entomol. bült.*, 1(2):99-107.
- Tosun H, Aktuğ Gönül Ş. (2003). E. coli O157: H7'nin Aside Tolerans Kazanması ve Asidik Gıdalarda Önemi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(10) : 10-17.
- ▼ Tsao SM, Yin MC. (2001). In vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol*, 50:646-49.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:2474-8.
- Tükel Ç, Doğan HB. (2000). Staphylococcus aureus. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbaacılık, Ankara, s.357-366.
- Ustaçelebi Ş. (1999) .Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Öncü Basımevi, Ankara, s.470-485.
- Uluğ M, Çelen MK, Ayaz C. (2009). Çoklu İlaç Direnci Gösteren Salmonella typhimurium'un Neden Olduğu Salmonelloz Olgusu. *Klinik Dergisi*, 22(2): 69-71.
- Wynnchuk M. (1994). Evaluation of xylene substitutes for paraffin tissue processing. *J. Histotechnol*, 17(5):143.

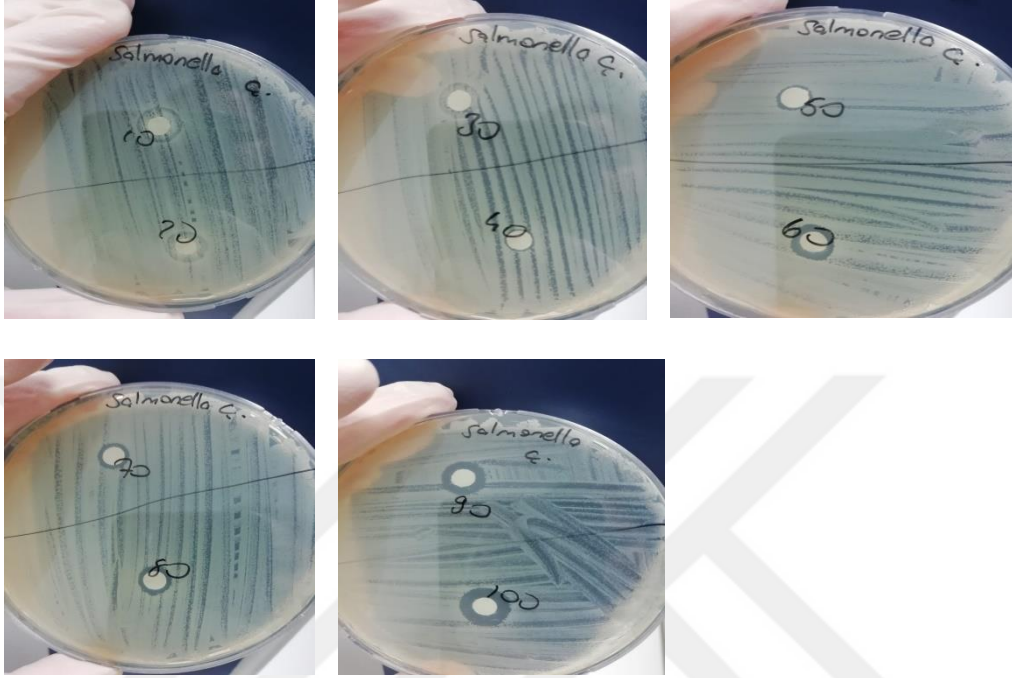
Van Vuuren SF, Docrat Y, Kamatou GPP, Viljoen. (2014). Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species. *South African Journal of Botany*, 92 :7–14.

Zhang X , Guo Y, Guo L, Jiang H and Ji Q. (2018). In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *BioMed Research International*, 2018

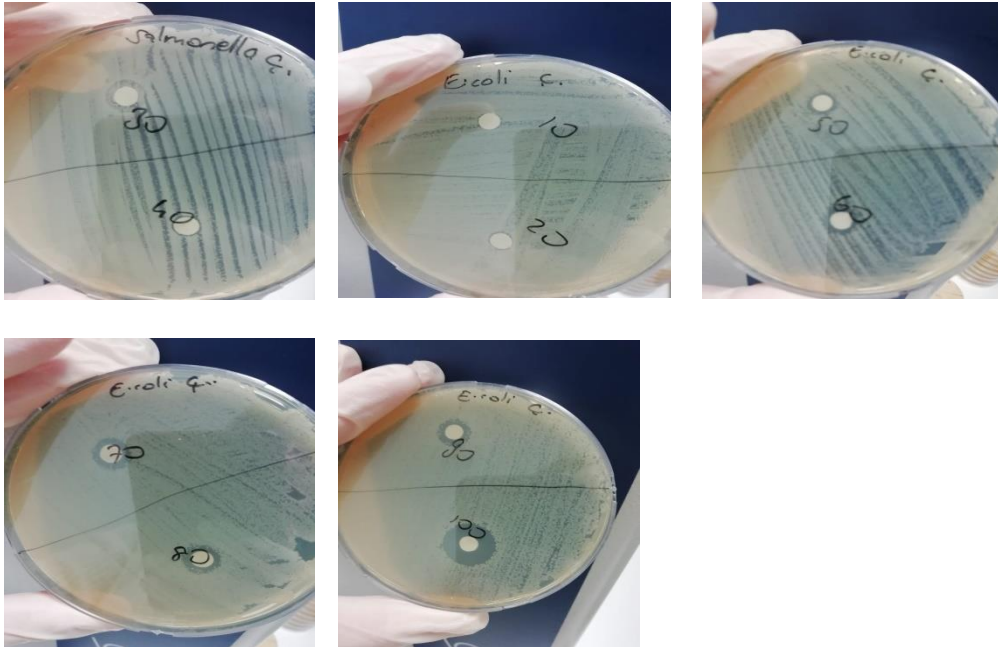


EKLER

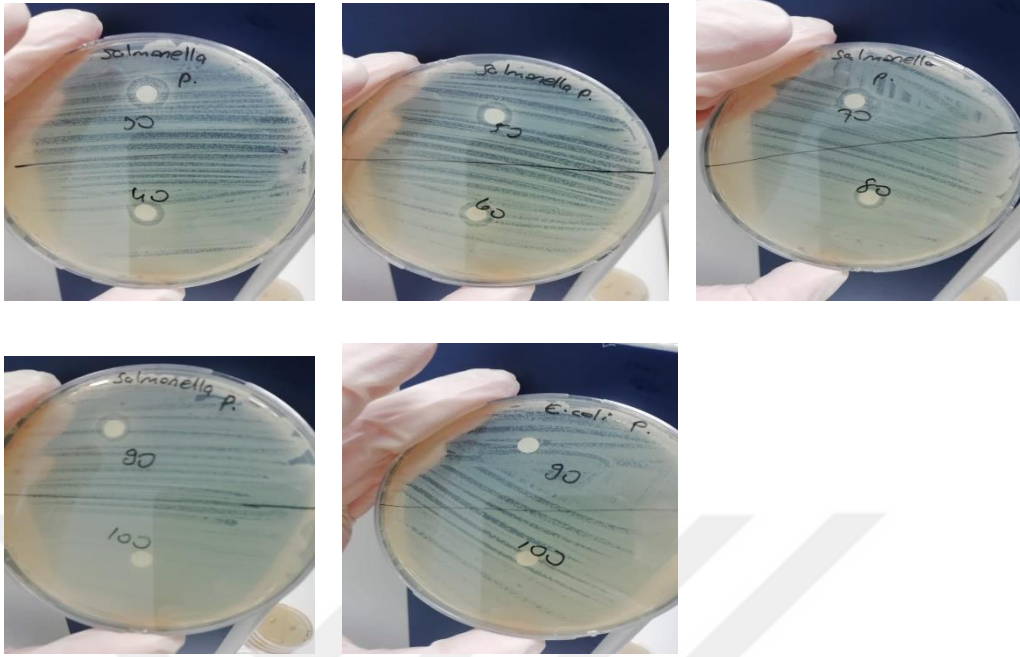
Ek.1. ay ağacı esansiyel yağının *S. typhimurium* üzerine olan etkisinin görüntüleri



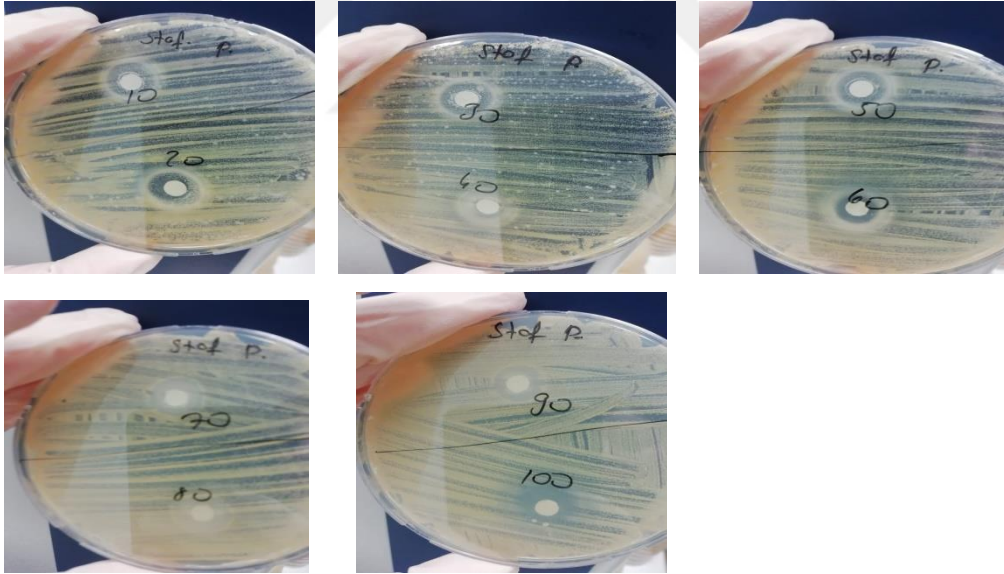
Ek.2. ay ağacı esansiyel yağının *E.coli* üzerine olan etkisinin görüntüleri



Ek.3. Portakal esansiyel yağının *S. typhimurium* üzerine olan etkisinin görüntüleri



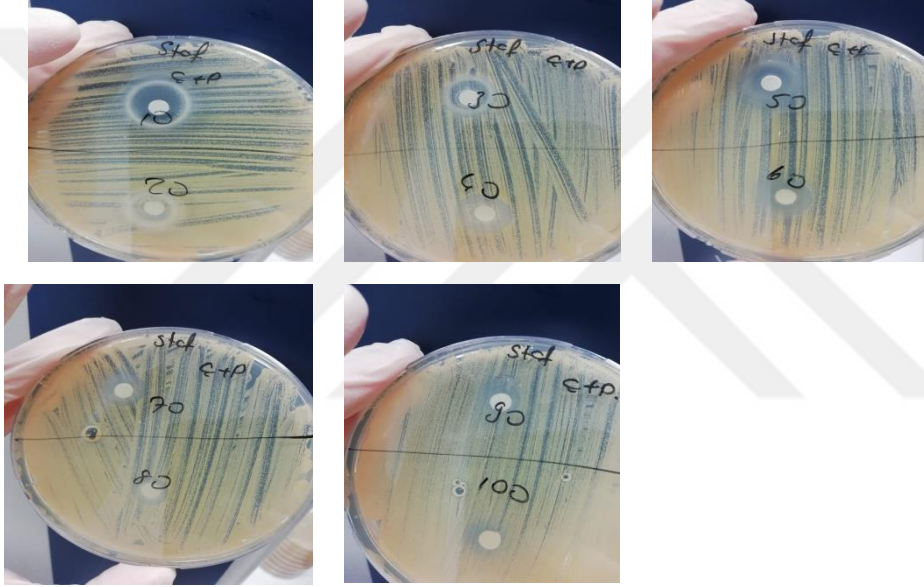
Ek.4. Portakal esansiyel yağının *S. aureus* üzerine olan etkisinin görüntüleri



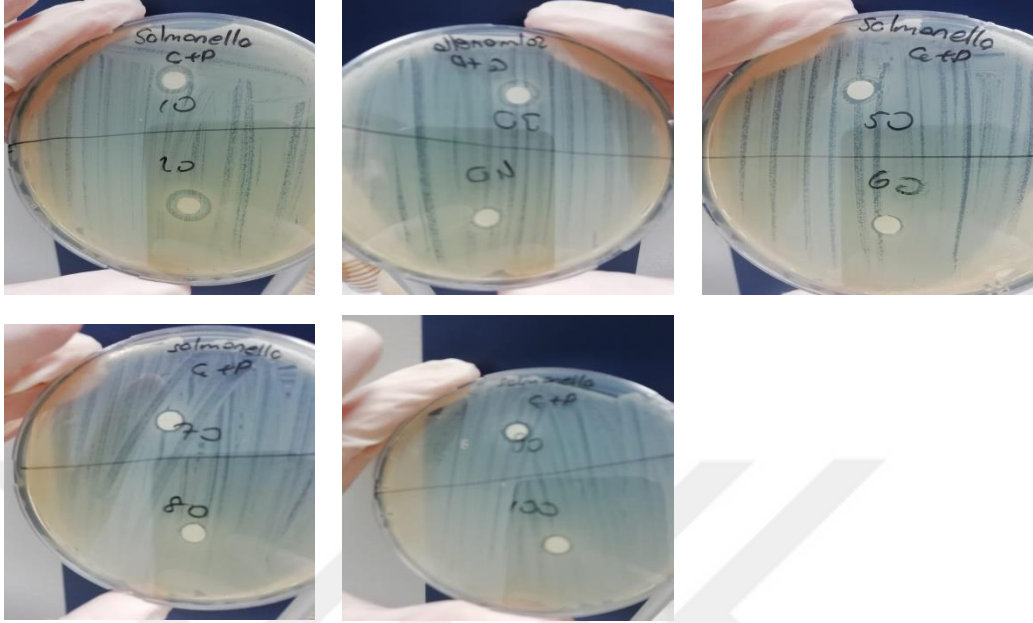
Ek.5. Portakal esansiyel yağının *E. coli* üzerine olan etkisinin görüntüleri



Ek.6. Çay ağacı ve portakal esansiyel yağı kombinasyonunun *S. aureus* üzerine olan etkisinin görüntüsü



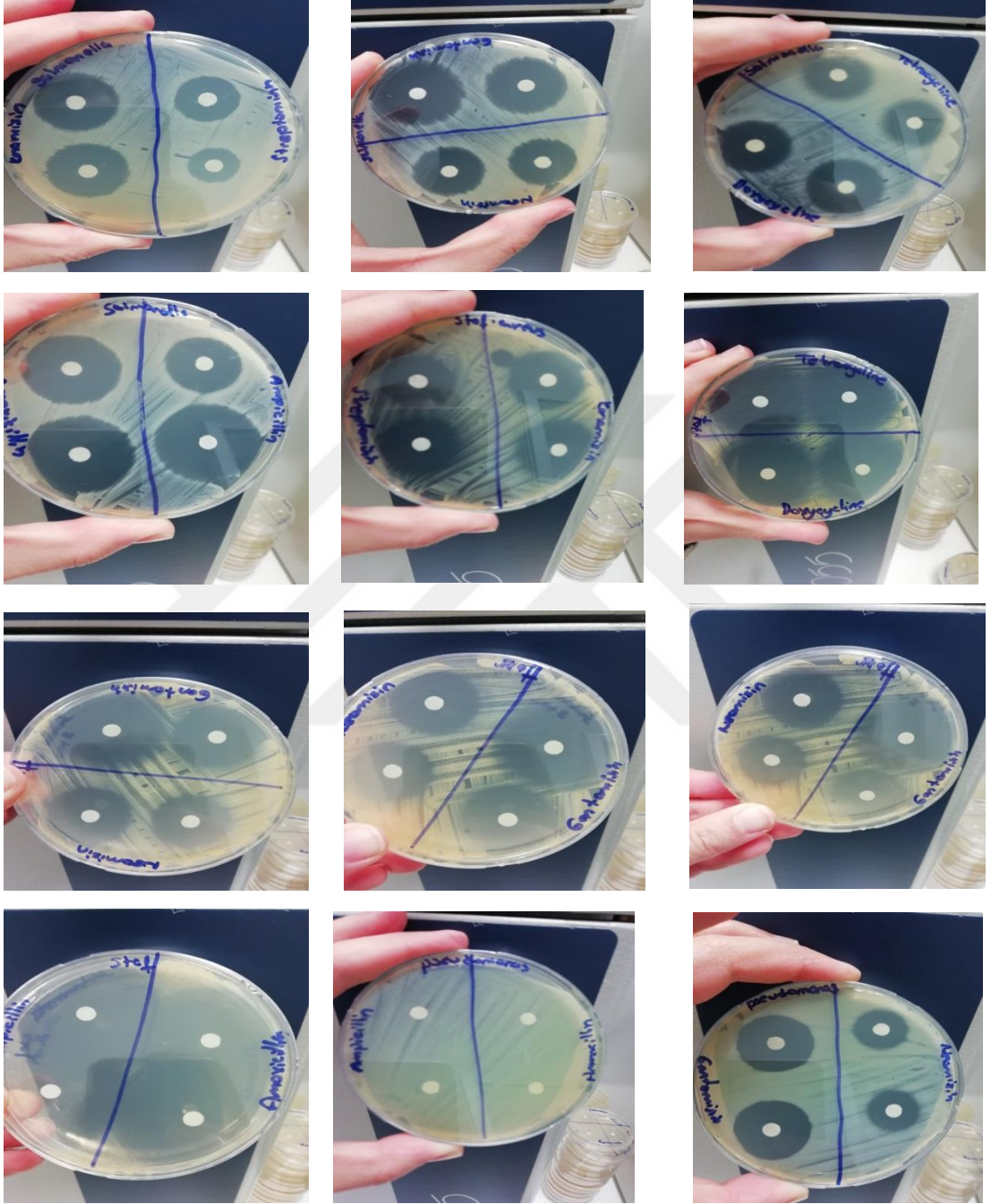
Ek.7. ay ağacı ve portakal esansiyal yağı kombinasyonunun *S. typhimurium* üzerine olan etkisinin gruntüsü



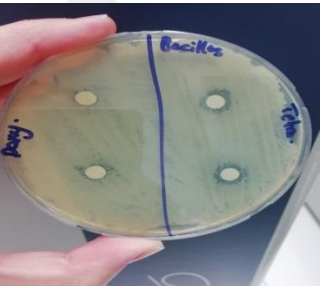
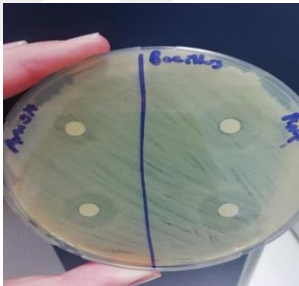
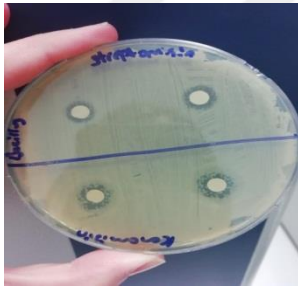
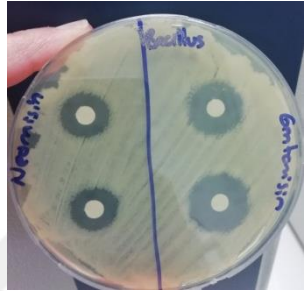
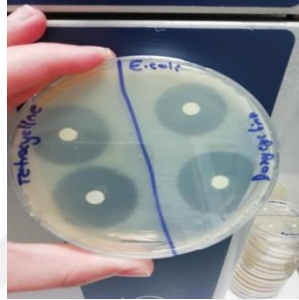
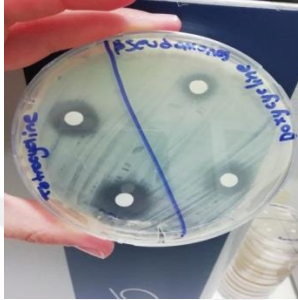
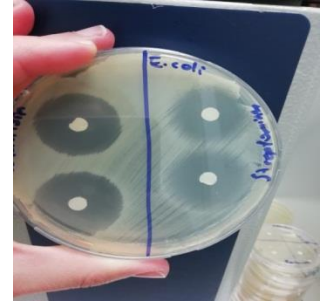
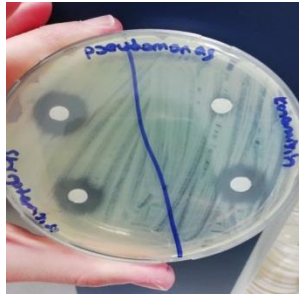
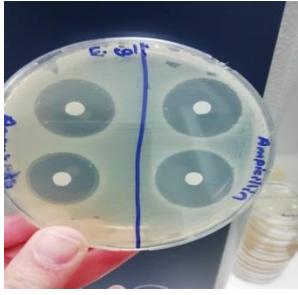
Ek.8. ay ağacı ve portakal esansiyal yağı kombinasyonunun *E. coli* üzerine olan etkisinin gruntüsü



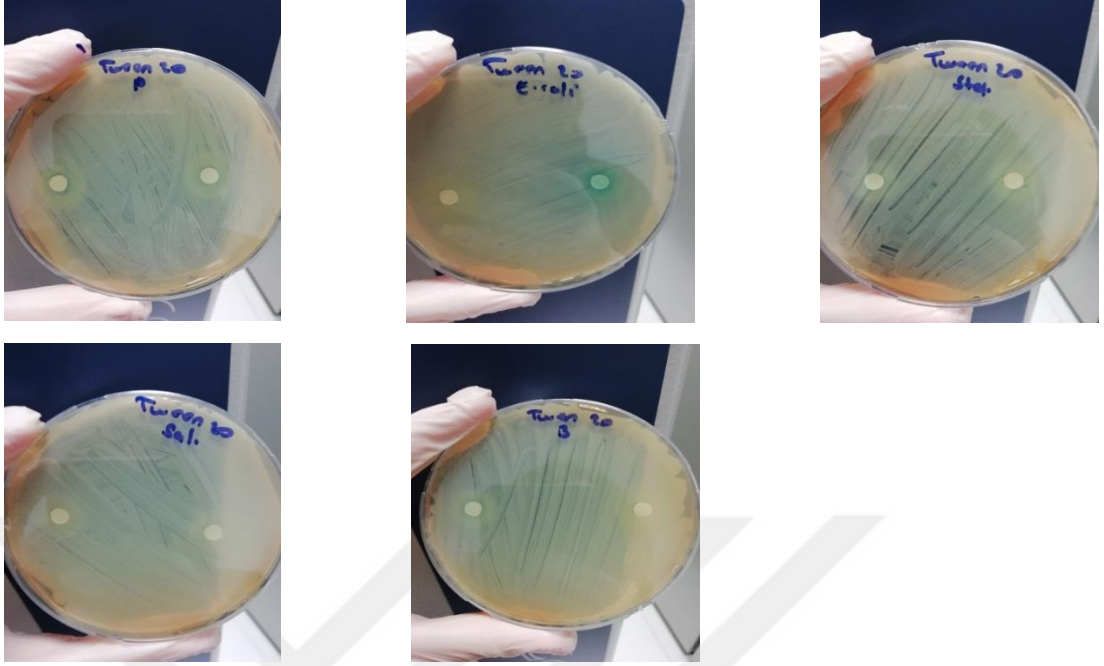
Ek.9. Kontrol grubu antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkisinin disk difüzyon testi ile belirlenmesi



(Ek 9 Devamı)



Ek.10. Tween 20' nin bakteriler üzerindeki etkisinin disk difüzyon testi görüntüleri



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Leyla DEMİR

Doğum yeri ve tarihi: İSTANBUL / 28.06.1987

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
ABD, Korucuk, Adapazarı, Sakarya 0264 295 31 40

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Pedagojik Formasyon Programı- 2014

Fatih Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü- 2010

İbrahim Turhan Lisesi – 2004

III- Ünvanları

Biyolog

Biyoloji Öğretmeni

IV- Mesleki Deneyim

1. Biyoloji Öğretmeni, Başer Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi, (2016- __)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Viral Hepatitle Savaşım Derneği (2014- __)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları

1. Özbek A, Demiray T, Koptaget E, Kucuk Ö, Demir L. (2019). Antimicrobiyal Properties of a Traditionally and Specially Prepared Oil Complex: NigellaSativa Seed Oil, Rosemary Oil and Olive Oil. *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology*, 7(5): 824-827.

2. Altındış M, Aslan FG, Köroğlu M, Eren A, Demir L, Usfan Mİ, Aslan S, Özdemir M, Baykan M. (2016). Tedavi Almamış Kronik Hepatit B Olgularında İlaç Direnci İlişkili Kompansatuvar Mutasyonlar. *Viral Hepat J*, 22(3):103-107.

VII- Bilimsel Etkinlikler

1. 2. Ulusal Tıp Kongresi ‘Geleceđin Tıbbı II’de "Kan Kùltürlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin İrdelenmesi"
(Poster)

VIII- Diğer Bilgiler

1. Güzellik & Psikoloji Sempozyumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakùltesi, 10.05.2017 (Katılım Belgesi)
2. Sterilizasyon Sempozyumu, İstanbul, 30.11.2017 (Katılım Belgesi)
3. 2. Ulusal Tıp Kongresi ‘Geleceğin Tıbbı II’, Sakarya, 25-27 Nisan 2014 (Katılım Belgesi ve Poster Sunumu)
4. Sağlık Bilimleri Araştırma Planlanması ve Bilimsel Makale Yazımı Veriden Yayına Modul II Kurs, Sakarya, 11 Mart 2015 (Teşekkür ve Katılım Belgesi)
5. EBSCO research database training session, Sakarya, 25.12.2014 (Katılım Belgesi)
6. Sağlık Bilimleri Araştırma Planlanması ve Bilimsel Makale Yazımı Modül1 Kurs, Sakarya, 24.12. 2014 (Teşekkür ve Katılım Belgesi)
7. Tıpta Güncel Flow Sitometri Uygulamaları, Sakarya, 10.12.2014 (Katılım Belgesi)
8. I.U. Cerrahpaşa Medical Faculty International Medical Student Research Congress, İstanbul, 11-13.03.2007 (Katılım Belgesi ve Poster Sunumu)

