

***Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*' un GIDA
PATOJENİ *Escherichia coli* O157:H7 ÜZERİNE ETKİSİ**

**EFFECT OF *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ON
Escherichia coli O157:H7**

AYŞEGÜL DEMİR

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2005

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ

Üye :.....
Yard. Doç. Dr. Ümran UYGUN

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Helichrysum plicatum DC. subsp. *plicatum*' un GIDA PATOJENİ *Escherichia coli* O157:H7 ÜZERİNE ETKİSİ

Ayşegül Demir

ÖZ

Koruyucu ajanlar, gıda endüstrisinde pek çok üründe gıda kalitesini korumak, ürünlerin raf ömrünü uzatmak ve gıda kaynaklı hastalıkları önlemek amacıyla kullanımı kaçınılmaz olan bileşenlerdendir. Ancak; tüketici tercihleri, kimyasal koruyucu maddelerin toksik ve kanserojen etkileriyle ilgili şüpheler nedeniyle, doğal gıdalara yönelmektedir. Bu yöneliş, günümüzde doğal koruyucu maddelerle ilgili çalışmaların hız kazanmasına yol açmaktadır.

Bu çalışmada, halk arasında şifalı bitki olarak bilinen ve literatürde antimikrobiyal etkisi olduğuna dair çalışmalar yer alan, *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisinin önemli bir gıda patojeni olan *Escherichia coli* O157:H7 karşısında antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak bitkinin ekstraktlarında etki araştırılmış daha sonra etken maddenin tespiti amacıyla etkili bulunan ekstraktların alt fraksiyonları ile çalışma sürdürülmüştür. Ancak alt fraksiyonlara inildiğinde bakteri karşısında inhibisyon etkisinin azaldığı ve aynı madde ile farklı zamanlarda yürütülen çalışmalarda zaman içinde etkinin azaldığı gözlenmiştir. Antibakteriyel etki çalışmalarının sonuçları istatistiksel analizler uygulanarak yorumlanmıştır.

Atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak yürütülen çalışmalarda antibakteriyel etkinin hücre çeperinde hasarlanmaya yol açtığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisinin çiçek kısımlarının etanol ekstraktının *Escherichia coli* O157:H7 karşısında, hücre çeperinde hasara yol açarak, en belirgin inhibisyon etkisini sağladığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli* O157:H7, *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*, atomik kuvvet mikroskobu, antibakteriyel etki

Danışman: Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

EFFECT OF *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ON *Escherichia coli* O157:H7

Ayşegül Demir

ABSTRACT

Preservative substances are unavoidably used in many products of food industry for protection of food quality, extension of shelf life and prevention of food borne diseases. However, consumers tend to consume natural foods because of the debate about chemical preservatives being toxic and carcinogenic. For this reason researches on naturally occurring antimicrobials are being increased rapidly.

In this study, effect of *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*, which is known as an ethnobotanical plant and reported for its antimicrobial effect, on a food borne pathogen, *Escherichia coli* O157:H7, was examined. For this purpose, firstly the effect of the extracts of the *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* has been examined and then the study has been carried on the fractions of the effective extract to specify the effective components. But it has been determined at the results of the study on fractions that the effect against the bacterium had decreased and that the effect of the same substances had decreased with time. The results of antibacterial effect studies have been analyzed statistically.

Studies carried on with the atomic force microscopy have showed that the antibacterial effect had result in damage at the bacterial cell wall.

As a result, it has been concluded that the ethanol extracts of flowering parts of *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* had shown the most significant inhibitory effect on *Escherichia coli* O157:H7 through destroying the bacterial cell wall.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*, atomic force microscopy, antibacterial effect

Advisor: Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ, Hacettepe University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve ilgisiyle yanımda olan değerli hocam, danışmanım, Sayın Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ' a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamızı ortak yürüttüğümüz, değerli katkı ve yönlendirmelerinden yaralandığım Sayın Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA' ya ve örneklerin temini ve hazırlanmasını sağlayan Sayın Yard. Doç. Dr. Mustafa ASLAN' a,

TAEK Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi' nde AKM çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz Sayın Dr. Erdal TAN' a, Sayın Emine AYDIN' a, Sayın Haydar DİŞBUDAK' a, Sayın Dr. Ali ALAÇAKIR' a,

Çalışmamın istatistiksel değerlendirilmesinde gösterdiği yardımlardan dolayı Sayın Dr. Nuri DOĞAN' a

Tez çalışmama katılımları ve çalışmamın yazılımında yol gösterici olan Sayın Araş. Gör. Birce MERCANOĞLU' na,

Laboratuar çalışmalarımızı uyum içinde yürüttüğümüz çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Ufuk BAĞCI, Araş. Gör. Ayla ŞENER, Araş. Gör. Sine ÖZMEN TOĞAY, Araş. Gör. Şule ŞENSES ERGÜL, Araş. Gör. Seda KARASU YALÇIN' a ve tez çalışmamın yazılması sırasında sabır ve destekleriyle katkıda bulunan arkadaşlarım Araş. Gör. Hacı Ali GÜLEÇ, Araş. Gör. Ayça YARALI' ya, Araş. Gör. Pelin ONSEKİZOĞLU ve Araş. Gör. Deniz BAŞ' a,

Laboratuar çalışmalarımda yardım ve ilgisi ile yol göstericim Dr. Betül VAZGEÇER' e ve öğrencilik hayatımdan itibaren her sıkıntımı paylaşan, desteğini esirgemeyen Uzman Yelda ZENCİR' e,

Tez çalışmamın başından itibaren anlayışlı ve özverili tavrı ile hep yanımda olan sevgili İlyas YILDIRIM' a,

Hayat boyu sevgileri ve sabırlı destekleri ile hep yanımda olan annem Gülseven DEMİR ve babam Özcan DEMİR' e içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayşegül DEMİR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	3
2.2. <i>Helichrysum plicatum</i> DC. subsp. <i>plicatum</i>	7
2.2.1. <i>Helichrysum</i> türlerinin halk ilacı olarak kullanılması	9
2.2.2. <i>Helichrysum</i> türlerinin antimikrobiyal etkileri.....	10
2.2.3. <i>Helichrysum</i> türlerinin antioksidan etkileri	19
2.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu	20
3. MATERYAL ve METOT.....	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Bitki örnekleri.....	24
3.1.2. Bakteri Kültürü.....	25
3.1.3. Dilüsyon sıvısı	25
3.1.4. Besiyerleri	25
3.1.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) deney düzeneği	25
3.1.6. Santrifüj cihazı.....	25
3.2. Metot.....	26
3.2.1. Kültürün hazırlanışı.....	26
3.2.2. Bitki materyallerinin hazırlanması	26
3.2.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması	27
3.2.2.2. H.Ç.E. fraksiyonlarının hazırlanması	27
3.2.3. Antibakteriyel aktivitenin araştırılması	30
3.2.4. AKM ile görüntü eldesi için örnek hazırlama	31
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	31
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA.....	33
4.1. Antibakteriyel Etki Bulguları.....	33
4.1.1. 18-24 Saatlik kültür ile yapılan deneme sonuçları	33
4.1.1.1. 18-24 Saatlik kültür ile yapılan ekstrakt çalışmaları sonuçları	33
4.1.1.2. 18-24 Saatlik kültür ile yapılan H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonlarının çalışmaları sonuçları	38
4.1.2. Seyreltilmiş Kültür İle Yapılan Deneme Sonuçları	44
4.1.2.1. Seyreltilmiş kültür ile yapılan ekstrakt çalışmaları sonuçları.....	44
4.1.2.2. Seyreltilmiş kültür ile yapılan H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonlarının çalışmaları sonuçları	49
4.2. AKM İle Görüntü Eldesine İlişkin Bulgular.....	56
5. TARTIŞMA VE YORUM.....	65
KAYNAKLAR.....	66
EKLER DİZİNİ	71
EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN DİLÜSYON SIVISI VE BESİYERLERİ	71
EK 2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI.....	74
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Helichrysum plicatum</i> DC. subsp. <i>plicatum</i> genel habitat görünüşü	6
Şekil 2.2. <i>Helichrysum plicatum</i> DC. subsp. <i>plicatum</i>	6
Şekil.2.3. Işık Mikroskobu, SEM ve AKM şematik gösterimi	23
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktları ve alt fraksiyonları.	24
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının yüzde verim değerleri	27
Şekil.3.3. Çalışmada kullanılan H.Ç.E. ileri ekstraktlarının yüzde verim değerleri	28
Şekil.3.4. H.Ç.E. ekstraktının ileri ekstraktlarının eldesi	29
Şekil 4.1. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	34
Şekil 4.2. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	35
Şekil 4.3. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	36
Şekil 4.4. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	37
Şekil 4.5. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	39
Şekil 4.6. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	40
Şekil 4.7. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	41
Şekil 4.8. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	42
Şekil 4.9. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	43
Şekil 4.10. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	45
Şekil 4.11. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	46
Şekil 4.12. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	47
Şekil 4.13. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	48
Şekil 4.14. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	50
Şekil 4.15. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	51
Şekil 4.16. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	52
Şekil 4.17. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	53
Şekil 4.18. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.....	54
Şekil 4.19. Bir hafta boyunca inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin 10x10 µm ² alanda çekilmiş topografik görüntüsü	58

Şekil 4.20. Bir hafta boyunca inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi	58
Şekil.4.21. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin 15x15 µm ² alanda çekilmiş* topografik görüntüsü.....	59
Şekil 4.22. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi.....	59
Şekil 4.23. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin 15x15µm ² alanda çekilmiş topografik görüntüsü	60
Şekil 4.24. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi	60
Şekil 4.25. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin 50 x 50 µm ² alanda çekilmiş topografik görüntüsü	61
Şekil 4.26. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi.....	61
Şekil 4.27. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin 30x30 µm ² alanda çekilmiş topografik görüntüsü	62
Şekil 4.28. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi	62
Şekil 4.29. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.E.A. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin 10x10 µm ² alanda çekilmiş topografik görüntüsü	63
Şekil 4.30. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.E.A. fraksiyonu ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi	63
Şekil 4.31. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.K. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin topografik 30 x 30 µm ² alanda çekilmiş görüntüsü.....	64
Şekil 4.32. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.K. ekstraktı ile inkübe edilmiş <i>E.coli</i> O157:H7' nin boyut analizi	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Türkiye’de yabani olarak yetişen <i>Helichrysum</i> türleri	7
Çizelge 2.2. Anadolu’da halk ilacı olarak <i>Helichrysum</i> türlerinin kullanımı.....	10
Çizelge 2.3. <i>Helichrysum aurenitans</i> köklerinin metanol,diklorometan ve su ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesi	13
Çizelge 2.4. Seçilmiş <i>Helichrysum</i> türlerinin anti-mikrobiyal aktiviteleri	14
Çizelge 2.5. <i>Helichrysum plicatum</i> DC. subsp. <i>plicatum</i> ekstraktlarının antibakteriyel etkisi	15
Çizelge 2.6: <i>Helichrysum cymosum</i> etanol ekstraktının test edilen dört bakteri üzerine MİK değerleri.....	15
Çizelge 2.7: <i>H. pedunculatum</i> ’ dan izole edilen oleik ve linoleik asidin antibakteriyel aktivitesi	16
Çizelge 2.8: <i>Helichrysum caespitium</i> kapitulum kısımlarının ham aseton ekstraktının ve 2. bileşenin antibakteriyal aktivitesi	17
Çizelge 2.9: <i>Helichrysum caespitium</i> kapitulum kısımlarının ham aseton ekstraktının ve 2. bileşenin antifungal aktivitesi.....	17
Çizelge 2.10: <i>Helichrysum kraussi</i> ve <i>H. rugulosum</i> türlerinin esansiyel yağları ve ana bileşenlerinin antimikrobiyal etkisi.....	18
Çizelge 3.1. <i>Helichrysum plicatum</i> ‘un alt türlerinin belirlenmesi için kullanılan tayin anahtarı	27
Çizelge 4.1. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	34
Çizelge 4.2. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	35
Çizelge 4.3. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	36
Çizelge 4.4. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	37
Çizelge 4.5. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.....	39
Çizelge 4.6. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.....	40
Çizelge 4.7. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.....	41
Çizelge 4.8. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.....	42
Çizelge 4.9. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.....	43
Çizelge 4.10. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	45
Çizelge 4.11. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	46
Çizelge 4.12. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	47

Çizelge 4.13. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	48
Çizelge 4.14. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	50
Çizelge 4.15. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	51
Çizelge 4.16. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	52
Çizelge 4.17. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	53
Çizelge 4.18. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
CDC	Centers for Disease Control & Prevention
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
STEC	Shiga toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
VTEC	Verotoksin üreten <i>Escherichia coli</i>
HK	Hemorojenik kolit
HUS	Hemolitik üremik sendrom
TTP	Hemotrombotik trombositopenik purpura
USDA	United States Department of Agriculture
FDA	Food and Drug Administration
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
İTK	İnce Tabaka Kromotografisi
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu-Transmission Electron Microscope
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu-Scanning Electron Microscope
STM	Taramalı Tünelleme Mikroskobu-Scanning Tunneling Microscope
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu-Atomic Force Microscope
K	Kontrol
AK	Alkol Kontrol

- H.Ç.E. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* çiçek etanol
- H.Ç.S. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* çiçek su
- H.Y.E. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* yaprak etanol
- H.Y.S. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* yaprak su
- H.Ç.E.E.A. H.Ç.E. etil asetat
- H.Ç.E.K. H.Ç.E. kloroform
- H.Ç.E.H. H.Ç.E. hekzan
- H.Ç.E.B. H.Ç.E. bütanol
- H.Ç.E.K.S. H.Ç.E. kalan su

1. GİRİŞ

Endüstriyel ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar halen büyük bir sorun olarak yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' nde yılda 6,5-33 milyon gıda kaynaklı hastalık oluştuğu ve bu vakaların yaklaşık 9000' inin ölümle sonuçlandığı belirtilmektedir. Pek çok gıdada, gıda kalitesini korumak, raf ömrünü uzatmak ve güvenliğini sağlamak için koruyucu maddelere gereksinim duyulmaktadır. (Dufour et al., 2003; Angulo et al., 2005).

Kimyasal koruyucu maddeler, kanser oluşumunda etkili oldukları ve kalıntılarının toksik etkisi olduğu görüşü kabul gördüğü için, güvenli kabul edilmeleri yönünde büyük oranda şüphe taşımaktadır. Bu sebeple tüketiciler tarafından kimyasal koruyucu içeren gıdalar yerine doğal gıdalar tercih edilmektedir. Tüketicilerin bu eğilimi gıdaların korunması amacıyla kullanılacak doğal koruyucu maddelerin araştırılmasına hız kazandırmaktadır (Barbour et al., 2004; Moreira et al., 2005).

Escherichia coli O157:H7, ABD Hastalık Denetimi ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control & Prevention-CDC) raporuna göre, nüfusun 100,000'de 2.9' unda ortaya çıkmaktadır. Bu bakterinin özellikle çiğ sığır etlerinde bulunma riski çok fazladır (Tamplin et al., 2005).

Tıbbi bitkiler, çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan değerli bitkisel ürünlerin elde edildiği doğal kaynaklardır (Cnandrasekaran and Venkatesalu, 2004). Yeni bitkisel terapötik ajanların etnofarmakolojik araştırmalarla keşfinin önemi yoğun bir şekilde tartışılmaktadır. Akut, tekrarlayan ve kronik enfeksiyonlar dünya çapında gerçekleşmektedir ve bunların tedavisi için son on yılda pek çok antiviral bileşen kullanıma sunulmuştur. Bu antiviral bileşenlerin tekrarlayan ve kronik enfeksiyonlarda etkinliklerinin değişmesi ve çok yüksek fiyatlarının yanı sıra bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde kullanımı da alternatif ilaçların araştırılmasını önemli kılmıştır. (Meyer et al., 1997).

Asteraceae familyası üyelerinden *Helichrysum* cinsine dahil olan türler, başlıca antimikrobiyal, anti-enflamatuvar, sindirim kolaylaştırıcı, safra artırıcı etkileri için halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Pek çok türünün çay halinde ya da pirince, sebzelere ve bazı meze türü gıdalara baharat olarak eklenerek kullanımları da mevcuttur. Bu türler triterpenoidler, steroidler, flavonoidler, hidroksi-izopentil

asetofenon ve floroglusinollerini içerir. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*, flavonoid içeren *Helichrysum* türleri içinde en zengin alt türlerden biridir. Bitki içeriğinin % 4,83'ü Helichrysin A ve B, apigenin, naringenin, isoastragalin ve isosalopurposit flavonoidlerinden oluşur (Erdoğan et al., 2001).

Helichrysum cinsine dahil olan bitki türlerinin tümünden ya da bazı kısımlarından elde edilen esansiyel yağlar ve ekstraktlar aromaterapi ve parfümeride kullanılmaktadır. Bu ekstraktların bazıları antibakteriyel etki göstermektedir (Cavalli et al., 2001).

Helichrysum plicatum bitkisi, mantuvar çiçeği mahalli adıyla anılmaktadır. Bitkinin çiçekleri kapitulumlar halinde bulunur. Bitkinin kapitulum kısımlarının Isparta yöresinde dekoksasyon halinde şeker hastalığı ve böbrek rahatsızlıklarında kullanıldığı belirtilmektedir (Aslan, 1994).

Bu çalışmada *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ekstraktlarının *E. coli* O157:H7 üzerine antimikrobiyal etkisi incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında bitkinin yaprak ve çiçek kısımlarının etil alkol ve su ekstraktlarının önemli bir gıda patojeni olan *E. coli* O157:H7 üzerine etkisi incelenip, incelenen ekstraktlar içinde en fazla etki gözlenen çiçek etanol ekstraktının ileri fraksiyonları ile denemelere devam edilmiştir. Oluşan etkinin araştırılmasında; petride toplam bakteri sayımı yöntemi kullanılmış ve atomik kuvvet mikroskopunda yüzey incelemeleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS programı kullanılarak yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Escherichia coli* O157:H7

E. coli, Enterobacteriaceae familyasına dahil, Gram-negatif, fakültatif anaerobik, sporsuz, hareketli, çubuk şeklinde bir bakteridir. Bakterinin tüm sıcakkanlı hayvanların bağırsak sisteminde normal mikrobiyal floranın bir parçası olarak bulunan kommensal suşları, konak için önemli fonksiyonları yerine getirirken aynı zamanda fekal bulaşı belirteci olarak da kullanılmaktadır. *E. coli*, fırsatçı patojen özellik göstermekte ve bu türe dahil olan bazı suşlar şiddetli diyare sendromlarına neden olabilmektedir. Ayrıca bazı patojen *E. coli* suşları enterotoksin üretebilmektedir (Abedon, 2005; Bell and Kyriakides, 2002).

Patojen *E. coli* suşları arasında enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC) bulunmaktadır. Son zamanlarda ortaya çıkan en önemli gıda kaynaklı patojen grubu Enterohemorajik (EHEC) *E.coli* aynı zamanda shiga toksin üreten *E.coli* (STEC) ve verotoksin üreten *E.coli* (VTEC) olarak da adlandırılmaktadır. EHEC Shiga toksinler (Stx1 ve Stx2) ve verotoksinler (VT1 ve VT2) adlı iki olası faj-kodlu sitotoksin meydana getirmektedir. Geviş getiren hayvanlardan başlıca sığır, koyun ve keçiler bu patojenin temel kaynaklarını oluşturmaktadır. İnsanlarda enfeksiyona yol açan insan ve hayvan kaynaklı EHEC suşları geniş bir O:H serotip grubuna dahildir. Ancak, meydana gelen hemorojenik kolit (HK), hemolitik üremik sendrom (HUS) vakaları genellikle O157:H7 serotipi ile ilişkilendirilmektedir. *E. coli* O157:H7 1982 yılında patlak veren hemorojenik kolit ile bir enteropatojen olarak tanımlanmıştır. Gıda patojeni olarak, nispeten yeni bir tehlike olan, *E. coli* O157:H7 bir enterohemorajik *E. coli* suşu olup gıda endüstrisinde önemli bir etkiye sahiptir. Son yıllarda bu mikroorganizma, istenmeyen karakteristik özellikleri nedeniyle gıda güvenliğine en ciddi tehditlerden biri haline gelmiştir. *E. coli* O157:H7, 1982 yılından bu yana kanamalı kolit teşhisi konulan hastalarda en sık rastlanan patojen haline gelmiştir. Bu organizmadan kaynaklanan gıda kaynaklı hastalıkları kontrol etmek ve minimize etmek için ön işlemler, üretim, satış ve tüketim sırasında uygulanan işlemlerin değiştirilmesi önemlidir. Yeni kontrol parametrelerine rağmen, *E. coli* O157:H7' nin yol açtığı, gıda kaynaklı hastalık sayısı pek çok ülkede artarak

devam etmektedir (William , 1998; Bell and Kyriakides, 2002; Sağdıç et al., 2002; Rijal et al., 2005-basımda; Mora et al., basımda).

1999 yılında gıda kaynaklı patojenlerden *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* ve *E. coli* O157:H7 ve diğer *E. coli* lerin yılda 6 milyondan daha fazla hastalığa neden olduğu ve bunların yaklaşık 9000 ölümlle sonuçlandığı belirtilmektedir. Bakteriyel patojenler, gıda kaynaklı hastalıkların yaklaşık olarak %60'ına ve gıda kaynaklı patojen nedenli ölümlerin tahminen üçte ikisine yol açmaktadır.Tahmini değerlere göre gıda kaynaklı patojen sorunlarının %4-5' ine O157 ve O157 olmayan *E.coli* neden olmaktadır. *E. coli* O157:H7 büyük miktarlarda toksin (Shiga toksinler) üreterek intestinal tabakaya ciddi zararlar verebilme yetisindedir (Koohmaraie et al., 2005-basımda).

E. coli O157:H7, ilk kez uygun olmayan şekilde hazırlanmış hamburgerlerin tüketilmesiyle meydana gelen, ciddi kanlı diyare vakasının nedeni olarak literatürde yer almıştır. Bu patojen, gıdalar yoluyla ya da genel yerlerin kullanımıyla taşınmakta ve 10 adet kadar düşük düzeyde vücuda alınması durumunda bile enfeksiyon oluşumuna sebep olabilmektedir. *E.coli* O157:H7 USDA (United States Department of Agriculture-USDA) ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından denetlenen bir patojendir ve bu nedenle gıda üreten işletmeler ürünlerinin bu patojenle kontamine olup olmadığını test etmek zorunluluğundadır (Ellingson et al., 2005; Koohmaraie et al., 2005; Rijal et al-basımda, 2005).

1982 yılında bir patojen olarak tanımlanmasından bu yana, *E. coli* O157:H7, başlıca Kanada, Japonya, İngiltere ve ABD' nde pek çok vakanın nedeni olarak tanımlanmaktadır (Mora et al., basımda).

ABD' nde yılda yaklaşık 73,000 *E. coli* O157:H7 ilintili gıda kaynaklı enfeksiyon vakası oluşmaktadır ve bunların 61'i ölümlle sonuçlanmaktadır. *E.coli* O157:H7'den kaynaklanan semptomlar diyare, kanlı diyare, karın krampları, düşük ateş halinde gözlenebilmekte ya da semptom oluşturmeyen enfeksiyonlar halinde gözlemlenebilmektedir. Enfeksiyonlar genellikle diyare, HK, HUS' a dönüşebilen gastroenterit ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) şeklinde gerçekleşmektedir. Çoğu hastalık yetersiz ısıl işlem görmüş ve kontamine olmuş kırmızı et tüketimi ile ilişkilendirilmektedir. Enfeksiyonlar iyi pişirilmemiş sığır eti

veya çiğ süt tüketimi sonrası ya da kanalizasyon suyu karışmış suların içilmesi ya da bu sularda yüzülmesi sonrasında da oluşabilmektedir. (Kim et al; 2004; Ellingson et al., 2005; Li and Logue, 2005; CDC, 2005; Anon., 2005c; Mora et al., basımda).

Kuzey Amerika'da rapor edilen gıda kaynaklı hastalıkların yaklaşık olarak %14' ü doğrudan minimum işlenmiş gıdalardan kaynaklanmaktadır. *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* gibi virulent patojenler bu tip vakalar ve gıda kaynaklı hastalıklarla ilintili bulunmaktadır. En sık rastlanan gıda kaynaklı patojenlerden biri olan *E.coli* O157:H7 minimum işlenmiş gıdalardan Brüksel lahanası, elma suyu, lahana, kereviz, kişniş ve marul ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar patojenlerin yetiştirilen bitkilere bulaşı ve canlılığını sürdürme riskinin düşünülenden daha fazla olduğunu göstermektedir (Jablasone et al., 2005).

Pek çok EHEC suşunun antimikrobiyal maddelerle inhibe edilebilmesine rağmen yapılan son araştırma sonuçları EHEC' in antimikrobiyal direncinin artmakta olduğunu göstermektedir. Antimikrobiyal maddeler insan ve hayvan ilaçlarında tedavi amaçlı rutin kullanımlarının yanı sıra besicilikte gelişimi teşvik etme ve hastalık önleme amaçlı da kullanılmaktadır. Tekrarlanan sub-letal antibakteriyel doz uygulamasının yalnızca kazanılmış dirençle değil, aynı zamanda antibiyotiklere karşı azaltılmış duyarlılıkla da sonuçlandığı gösterilmiştir (Mora et al., basımda).

Moreira et al., (2005) yaptıkları çalışmada sarımsak ve karanfilin *E.coli* O157:H7 üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) etkisini tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Ancak çalışmada, aynı bitkilerle daha önce çalışma yapan Leuschner and Zamparini (2002)' nin *Salmonella* ve *E.coli* O157:H7 üzerine bakteriyostatik ve bakteriyosidal (0.25 ila 1.0 mL/100mL) etki bulunduğu belirtilmektedir. Sonuçların farklı çıkmasının hasat öncesi parametrelerin (çeşitlilik, iklim koşulları, ekolojik faktörler, vd.) esansiyel yağ içeriği üzerindeki etkisi ile bağlantılı olabileceği öne sürülmektedir.



Şekil 2.1. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* genel habitat görünüşü (Anon., 2005a).



Şekil 2.2. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* (Anon., 2005b).

2.2. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*

Günümüzde yeni ilaç formülasyonlarında, tarım ilaçlarında ve diğer ticari ürünlerde kullanmak amacıyla bitkiler üzerine yapılan araştırmalar canlılık kazanmıştır. (Karaman and Kocabas, 2001).

Helichrysum cinsi, Asteraceae familyasına ait bir cins olup, dünyanın farklı bölgelerine dağılmış, yüzlerce türden oluşmaktadır. *Helichrysum* türlerinin yüksek derecede polimorfizme sahip olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda bazılarının önemli düzeyde farmakolojik özellikler gösterdiği ve parfümeride geniş kullanım alanı bulduğu belirtilmektedir (Bianchini et al, 2001).

Helichrysum cinsi, dünya üzerinde yaygın dağılımı ve kimyasal içeriğinin zengin olması ile halk arasında kullanımı yaygın bir bitki topluluğudur. Yeryüzünde; Akdeniz Bölgesi, Ön Asya, Tropik Afrika, Güney Afrika, Madagaskar ve Avustralya (Yeni Zelanda) bölgelerinde, 500' den fazla *Helichrysum* türü bulunmaktadır. Aslan (1994), yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye' de yabani olarak yetiştiği kesinlik kazanan *Helichrysum* türü sayısının 18 olduğunu belirtmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Türkiye'de yabani olarak yetişen *Helichrysum* türleri (Aslan, 1994)

<i>H. sanguineum</i> (L.) Kostel Kupicha	<i>H. pampilicum</i> * Dawis-
<i>H. stoechas</i> (L.) Moench subsp. <i>barrelieri</i> (Ten.) Nyman	<i>H. orientale</i> (L.) D.C. <i>H. compactum</i> * Boiss
<i>H. chasmolycicum</i> * P.H. Davis	<i>H. noenaum</i> * Boiss
<i>H. heywoodianum</i> * P.H. Davis	<i>H. chionophilum</i> * Boiss.-Bal
<i>H. pallasii</i> (Sprengel) Ledeb	<i>H. armenium</i> D.C.
<i>H. graveolens</i> (Bieb) Sweet	subsp. <i>armenium</i>
<i>H. arenarium</i> L. (Moench) Takht.	subsp. <i>araxinum</i> (Kirp.)
subsp. <i>rubicundum</i> (C. Koch) Davis-Kupicha Kupicha	<i>H. artvinense</i> * Davis-
subsp. <i>aucheri</i> * (Boiss.) Dawis-Kupicha	<i>H. peshmanianum</i> * S.Erik
subsp. <i>erzincanicum</i> * Dawis-Kupicha	<i>H. kitianum</i> * Yıldız
<i>H. plicatum</i> D.C.	<i>H. sivasicum</i> * Kit Tan-Yıldız
subsp. <i>plicatum</i>	
subsp. <i>polyphyllum</i> (Lebeb) Davis-Kupicha	
subsp. <i>pseudoplicatum</i> (Nab) Davis-Kupicha	

(*) Endemik Türler

Helichrysum cinsi Avrupa florasında; halk ilacı olarak kullanılan, taksonomik açıdan kompleks bir bitki grubu olarak tanımlanmaktadır (Czinner et al., 2000). *Helichrysum* cinsine dahil olan türlerin morfolojik görünüşleri pek çok modifikasyondan etkilendiği için bu cinsin taksonomik belirlenmesi çoğu zaman kesin olamamaktadır (Ruberto et al., 2002).

Flavonoidler, kimyasal yapıları ve karakteristik özelliklerinde farklılık gösteren bir polifenolik bileşenler topluluğudur. Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde ve bitkilerin tohum, çiçek, kabuk kısımlarında bulunan doğal bileşenlerdir. Bu bileşenlerin, antibakteriyel, antiviral, anti-enflamatuvar, antialerjik ve damar tıkanıklığına karşı etkilerini kapsayan geniş bir aralıkta biyolojik aktivite içerdiğine dair bulgular vardır. Ayrıca flavonoidler, lipid peroksidasyonunu, kanda pıhtı oluşumunu, kapiler geçirgenliğini ve çatlamlarını, siklo-oksijenaz ve lipoksijenaz enzim sistemleri aktivitesini inhibe etme özelliğine sahiptir. Flavonoidlerin bu etkileri antioksidan, serbest radikal yakalayıcı ve divalent katyon kelatlaştırma davranışları ile ilişkilendirilmektedir (Cook and Samman, 1996; Naidu et al., 2000).

Helichrysum cinsine dahil olan türler, başlıca antimikrobiyal, anti-enflamatuvar, sindirim kolaylaştırıcı ve safra artırıcı özellikleri nedeniyle halk ilacı olarak kullanılmaktadırlar. Pek çok türünün çay halinde ya da pirince, sebzelere ve meze türü gıdalara eklenen yemeklik baharatlar olarak kullanımları da mevcuttur. Bu türler triterpenoidler, steroidler, flavonoidler, hidroksi-izopentil asetofenon ve floroglusinollerini içerir. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*, flavonoid içeren *Helichrysum* türleri içinde bu anlamda en zengin türlerden biridir. Bitki içeriğinin % 4,83'ü Helichrysin A ve B, apigenin, naringenin, isostragalın ve isosalopurposit flavonoidlerinden oluşur (Erdoğan et al., 2001).

Türkiye'de *Helichrysum* türlerine verilen mahalli adlar kimi araştırmacıların çalışmalarında yer almaktadır. Sezik (1977) kudama çiçeği, daz çiçeği, sevgül; Baytop (1984) ve Sezik vd. (1991) altın çiçeği, altın otu, arı çiçeği, güve otu, haşışeyi layemut, hardemtaze, kovan otu, mantuvar çiçeği, sarı çiçek, yayla çiçeği, yılan çiçeği; Tabata et al.,(1986) ve Yeşilada et al.,(1993) herdem güzeli, kocaman çiçeği, bozoğlan, sarısavran, taş gülü, yılan gülü; Tabata et al.,(1993) kaymak çiçeği, sarılık çiçeği, peygamber düğmesi, bohça çiçeği, menekşe, arı otu, mantuvar, arı çiçeği, herdemcan, günendi, gündoğdu; Baytop (1963) güven otu;

Yıldırım (1987) alaycık çiçeği; Baytop (1994) alay çiçeği, altınbaşak, leblebi çiçeği, mantı çiçeği, mantıvar, ölmez çiçek, güneş çiçeği, solmaz çiçek, solmaz sarı çiçek, guddeme çiçeği (Aslan, 1994).

Akdemir (1985) Avrupa'da *Helichrysum* türlerinin; Strumblume, İmmortelle, Strombloem (Hollanda); Evöighedablomst (Danimarka); Sun-gold, Everlasting (İngiltere); Immortelle, Eternelle (Fransa); Solfini, Fignamica, Elicriso (İtalya); Neven, Molec, Smill (Çekoslovakya); Slamjanka (Yugoslavya), Koçanki (Polonya); Cmin (Rusya) şeklinde isimlendirildiğini belirtmiştir (Aslan, 1994).

2.2.1. *Helichrysum* türlerinin halk ilacı olarak kullanılması

Avrupa'ya özgü, sarı çiçekli bir çalı bitkisi olan *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae) kurak, kumlu ve taşlık alanlarda yetişmekte ve Akdeniz yöresinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkinin çiçekli baş kısmı, anti-enflamatuvar ve anti-alerjik özellikleri nedeniyle halk arasında ilaç olarak; ayrıca güneş yanıklarının tedavisi için de kullanılmaktadır. Fitokimyasal çalışmalarda *Helichrysum italicum* bitkisinden esansiyel yağlar, asetofenoller, floroglukinoller ve flavonoidler yapısında pek çok bileşen madde izole edilip tanımlanmıştır (Nostro et al., 2001).

Helichrysum cinsine dahil olan, *H. litoreum* gibi türlerin halk ilacı olarak kullanımı Yunan-Roma devrinden beri bilinmektedir. Günümüzde de, bitkinin güneşte kurutulmuş çiçek kısımları bronşital astıma karşı tütsü olarak ve ezilmiş hali diş taşlarına karşı kullanılmaktadır (Ruberto et al., 2002).

Helichrysum türlerinin genellikle kapitulmaları Anadolu' da halk ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Helichrysum* türlerinin genellikle infüzyon veya dekoksionu halinde halk ilacı olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Böbrek taşlarını düşürmek amacıyla 10 gün boyunca yemeklerden önce bir bardak içildiği, 10 gün ara verildikten sonra tekrar aynı şekilde kullanıldığı belirtilmiştir (Aslan, 1994).

Helichrysum plicatum DC. bitkisi, mantıvar çiçeği mahalli adıyla anılmaktadır. Bitkinin kapitulum kısımlarının Isparta yöresinde dekoksion halinde şeker hastalığı ve böbrek rahatsızlıklarında kullanıldığı belirtilmektedir (Aslan, 2000).

Karaman and Kocabas (2001), *Helichrysum plicatum* bitkisinin K. Maraş yöresinde çiçek kısmının üriner fonksiyon yetmezliklerinde ve anti-fungal olarak kullanıldığı araştırma dahilinde belirtilmektedir.

Helichrysum plicatum infüzyonu Gümüşhane civarında yara ve yanıklara karşı; Tokat ve civarında el ve ayaklardaki çatlakların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Bitkinin dekoksion ve infüzyonunun Amasya, Osmaniye (Adana), Erdemli (Mersin), Sütçüler (Isparta), Sarıevliler (Karaman) ve Domaniç (Kütahya) civarında böbrek taşlarına karşı, taş düşürücü, idrar artırıcı olarak kullanımı tespit edilmiştir. Elmalı (Antalya) civarında ise dekoksionu damla şeklinde kulak ağrısı için kullanılmaktadır (Aslan, 1994).

Çizelge 2.2. Anadolu'da halk ilacı olarak *Helichrysum* türlerinin kullanımı (Aslan, 1994)

Bölge	Kullanılış amacı
Beyşehir(Konya) Isparta	Mide ağrısına, böbrek taşlarına karşı kalp atışlarındaki düzensizliğe karşı böbrek taşlarına karşı
Şuhut (Afyon) Kütahya	karın ağrısına karşı böbrek hastalıklarına karşı ve taş düşürücü sarılığa karşı
Bilecik Yozgat	karın ve böbrek ağrılarına karşı yara tozu olarak
Tokat	ishale karşı
Ardahan Ağrı	kalp atışlarındaki düzensizliğe karşı

Güney Afrika'da *H. cymosum* ağrı kesici, antimikrobiyal, iltihaplanma ve enfeksiyon önleyici olarak kullanılmaktadır (Stafford et al., 2005).

Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalara karşı, Güney Afrika geleneksel tedavi ilaçlarının etkisi üzerine pek çok yayınlanmış rapor olmasına rağmen yara tedavisinde, özellikle bu ilaçların antibakteriyel kullanımından bahseden, yalnızca üç yayın bulunabilmiştir (Steenkamp et al., 2004).

2.2.2. *Helichrysum* türlerinin antimikrobiyal etkileri

Bitkiler, baharatlar ve bunlardan elde edilen esansiyel yağlar ve ekstraktların antimikrobiyal özellikleri üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bitkilerin bileşimleri

ve dolayısıyla antimikrobiyal etkilerinin bitki türüne ve bölgesel şartlara bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, esansiyel yağların kimyasal kompozisyonu ile antimikrobiyal etki arasında bir ilişki olduğu belirtilmektedir. Örneğin; kekik türü baharatların antimikrobiyal etkisinin içeriğindeki karvakrol ve timolden kaynaklandığı bilinmektedir (Sağdıç and Özcan , 2003).

Helichrysum türleri halk arasında antimikrobiyal özellikleri ile tanınırlar; *H. plicatum*, *H. arenarium* ve *H. graveolens* ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri olduğu belirtilmektedir. Ancak bu etkiyi sağlayan bileşenlerle ilgili literatürde çok az bilgi bulunmaktadır. Thomás-Barerán et al. (1990) yaptıkları çalışmada *H. decumbens*, *H. stoechas* ve *H. italicum* türlerinin kapitulum kısımlarından elde ettikleri floroglusinol ve asetofenon türevlerini antibakteriyel (anti-Gram-pozitif) bileşenleri olarak tanımlamışlardır. Floroglusinol türevlerinin asetofenon türevlerinden sekiz kat daha fazla antibakteriyel etki gösterdiğini, ancak asetofenonların Gram-negatif bakteriler üzerine de etkili olduğunu belirtmişlerdir (Thomás-Barerán et al., 1990; Nostro et al., 2001).

Güney Afrika, Madagaskar, İspanya ve Avustralya' da yetişen pek çok *Helichrysum* türünün kimyasal bileşimi yapılan araştırmalarda incelenmiştir. *Helichrysum* türlerinin, asetofenoller, flavonoidler, floroglusinoller gibi ikincil metabolitleri bakteriler ve funguslar karşısında etkili bileşenler olarak dikkati çekmektedir (Mathekga et al., 2000).

Afrika toplumlarında , etnik ilaç kullanımı çok yaygın olduğu için pek az insan sağlık kuruluşlarına başvurmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin maliyetleri bu insanlar için karşılanamayacak kadar yüksektir. Etnik ilaç olarak kullanılan bitki türlerinin çok geniş olmasına rağmen, henüz çoğunun antimikrobiyal etkisi kanıtlanmamıştır. Steenkamp et al.(2004) yaraların iyileştirilmesinde (etnomedikal) etnik ilaçlar kullanımına bağlı olarak dokuz çeşit bitki ile çalışma yapmıştır. Yapılan çalışmada *Helichrysum foetidum* türünün metanol ve su ekstraktlarının, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Bu bakteriler için ilgili bitki ekstraktının MİK değeri >4 mg/mL olarak rapor edilmiştir. *Helichrysum* cinsinin çeşitli türleri ve bileşenlerinin antimikrobiyal aktivite gösterdiği literatürde olmasına rağmen, *Helichrysum foetidum* için herhangi bir antibakteriyel etki

bilgisine rastlanmamaktadır. Steenkamp et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada da bitkinin metanol ve su ekstraktları için antibakteriyel etki bulunamadığı belirtilmektedir.

Lall and Meyer (1999) seçtikleri şifalı Güney Afrika bitkilerinin isoniazid ve rifampin ilaçlarına duyarlı (H37Rv) ve dayanıklı (CCKO28469V) *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada petride gerçekleştirilen inhibisyon aktivitesi denemelerinde *H. odoratissimum* aseton ekstraktlarının 0.5 mg/mL konsantrasyonunda; *H. melenacme* su ekstraktının 1.0 mg/mL konsantrasyonunda, aseton ekstraktının ise 0.5 mg/mL konsantrasyonunda *M. tuberculosis* H37Rv suşu üzerine inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Radyometrik yöntemle inhibisyon aktivitesi belirlenmesi denemesi sonucunda; *H. odoratissimum* ekstraktının *M. tuberculosis* H37Rv ve CCKO28469V suşları üzerine 0.5 mg/mL konsantrasyonunda etki gösterdiği; *H. melenacme* ekstraktının ise *M. tuberculosis* H37Rv suşu üzerine 0.5 mg/mL konsantrasyonunda, *M. tuberculosis* CCKO28469V suşu üzerine 0.1 mg/mL konsantrasyonunda etki gösterdiği belirtilmiştir (Lall and Meyer,1999).

Meyer and Afolayan (1995) *Helichrysum aureonitens* ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Bu amaçla kullandıkları diklorometan (CH₂Cl₂) ekstraktının çalışılan 5 Gram-pozitif bakteri üzerine de etki gösterdiği; metanol (MeOH) ekstraktının yalnızca , *B.pumilus* ve *Micrococcus kristinae* üzerine gösterdiği; su (H₂O) ekstraktının hiçbir organizma üzerine etki göstermediği belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve elde edilen bulgular Çizelge 2.3' de belirtilmektedir.

Nostro et al. (2000) bitki ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri üzerine yaptıkları karşılaştırmalı bir çalışmada *H. italicum* dietil eter ekstraktının *S. aureus* karşısında çalışılan bitki ekstraktları içinde en iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Nostro et al.,2000).

Nostro et al. (2001) *H. italicum* dietil eter ekstraktının *S. aureus* suşlarının gelişimleri üzerine etkilerini ve virulanslığı artırdığı kabul edilen bazı enzimlerin subminimum konsantrasyon (sub MİK) değerlerini saptamaya yönelik bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmanın sonuçları *H. italicum* ekstraktının *S. aureus*

üzerinde hem gelişimini hem de koagülaz, DNAaz, termonükleaz ve lipaz gibi enzimlerinin aktivitesini azaltarak bir inhibisyon etkisi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 2.3. *Helichrysum aurenitans* köklerinin metanol, diklorometan ve su ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesi (Meyer and Afolayan, 1995).

Bakteri türü:	Gram (+/-)	MİK ^a		
		MeOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
<i>Bacillus cereus</i>	+	1.0	0.5 ^b	ad ^c
<i>B. pumilus</i>	+	2.5	1.0	ad
<i>B. subtilis</i>	+	ad	2.0	ad
<i>Micrococcus kristinae</i>	+	0.5	0.5	ad
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ad	1.5	ad
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	ad	ad	ad
<i>E. coli</i>	-	ad	ad	ad
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ad	ad	ad
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ad	ad	ad
<i>Serratia marcescens</i>	-	ad	ad	ad

^a Minimum inhibisyon konsantrasyonu.

^b Test edilen en düşük ekstrakt konsantrasyonu.

^c Aktif değil.

Lourens et al. (2004), *Helichrysum* cinsine dahil dört türün antimikrobiyal antioksidan ve anti-enflamatuvar özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmada bitki ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans* ve *Candida albicans* türleri üzerine antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, ekstraktların ve esansiyel yağların Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Çizelge 2.4).

Antibiyotik ya da dezenfektan gibi bir maddenin bakterisidal etkisinin belirlenebilmesi için pek çok yöntem kullanılabilir. Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde kullanılan tekniklerden biri olan disk difüzyon yönteminin uygulanmasında; steril kağıt disklere belirli miktarda hazırlanan test çözeltisi emdirilip oda sıcaklığında kurutulmaktadır. Yüzeğe yayma yöntemi ile ekim yapılmış petriyelerin yüzeyleri 5 dakika kurutulduktan sonra diskler yerleştirilip inkübasyon aşamasına geçilir. İnhibisyon zonu disk kenarından mikrobiyal gelişimin başladığı bölgeye kadar ölçülerek antimikrobiyal etki belirlenir. Antimikrobiyal maddenin etkinliği arttıkça oluşacak zon çapı da artacaktır. (Cnandrasekaran and Venkatesalu, 2004; Kovacs et al., 1998).

Çizelge 2.4. Seçilmiş *Helichrysum* türlerinin anti-mikrobiyal aktiviteleri (Lourens et al., 2004)

Türler	Disk difüzyon çapı(mm)		MİK(µg/mL)	
	<i>B. cereus</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>B. Cereus</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Helichrysum dasyanthum</i>				
Aseton ekstraktı	14	9	312.5	15.63
Metanol ekstraktı	10	<5	312.5	312.5
Esansiyel yağlar	2	<1	4000	ad ^a
<i>Helichrysum excisum</i>				
Aseton ekstraktı	9	8	312.5	312.5
Metanol ekstraktı	8	4	62.5	2000
Esansiyel yağlar	15	0	2000	ad
<i>Helichrysum felinum</i>				
Aseton ekstraktı	8.5	7	156.25	156.25
Metanol ekstraktı	4	5	500	250
Esansiyel yağlar	1	0	ad	ad
<i>Helichrysum petiolare</i>				
Aseton ekstraktı	4	2.5	500	312.5
Metanol ekstraktı	9	7	312.5	625
Esansiyel yağlar	0	<1	ad	8000

^a: Aktif değil.

Erdoğrul et al. (2001), disk difüzyon metodu ile, çeşitli *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ekstraktlarının 15 farklı bakteri tür ve suşu üzerine antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, bitkinin yaprak, gövde ve çiçek kısımlarının etil asetat, metanol, kloroform ve aseton ekstraktları kullanılmıştır. 50 µL'lik ekstraktlarla yapılan çalışma sonucunda verilen inhibisyon zon çapı değerleri Çizelge 2.5' de verilmektedir.

Stafford et al. (2005) yaptıkları çalışmada çeşitli popüler Güney Afrika tıbbi bitkilerinin kimyasal kompozisyonları ve biyolojik aktiviteleri üzerine depolamanın etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla Afrika' da kullanımları yaygın olan, farklı depolama süreleri sonunda, dokuz şifalı bitkinin in vitro biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla taze, 90 günlük, 1 yıllık ve 5 yıllık bitkilerin su, etanol ve hekzan ekstraktları dört farklı bakteri suşu üzerine antibakteriyel aktivitesi ve siklooksigenaz inhibisyon aktivitesi incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarında antibakteriyel etkinin genel olarak değişim göstermediği ancak siklooksigenaz inhibisyon aktivitesinin zamanla kaybolduğu belirtilmektedir. *Helichrysum cymosum* türü için verilen çalışma sonuçları Çizelge 2.6' da verilmektedir.

Çizelge 2.5. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ekstraktlarının antibakteriyel etkisi (Erdoğan et al., 2001)

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zonu (mm)							
	<i>Helichrysum plicatum</i> DC.subsp. <i>plicatum</i> ekstraktları							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacillus brevis</i> FMC 3	-	20	18	-	20	21	22	25
<i>B. megaterium</i> DSM 32	-	16	18	-	21	21	22	21
<i>B. subtilis</i> IMG22	-	-	-	-	21	20	19	-
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 10	17	20	20	17	18	18	17	18
<i>Corynebacterium xerosis</i> UC9165	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> DM	-	17	19	-	25	26	29	31
<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A	19	20	-	18	18	19	18	-
<i>Micrococcus luteus</i> LA 2971	-	15	14	-	20	22	20	24
<i>Mycobacterium smegmatus</i> RUT	13	-	-	-	20	23	23	27
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	23	24	23	30
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	16	17	-	23	27	24	30
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 P 41797	-	20	20	-	13	19	24	25

1. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* çiçeklerinin aseton ekstraktları,
2. Gövde ve yaprakların aseton ekstraktı,
3. Çiçeklerin metanol ekstraktı,
4. Gövde ve yaprakların metanol ekstraktı,
5. Çiçeklerin kloroform ekstraktı,
6. Gövde ve yaprakların kloroform ekstraktı,
7. Çiçeklerin etil asetat ekstraktı,
8. Gövde ve yaprakların etil asetat ekstraktı.

Çizelge 2.6: *Helichrysum cymosum* etanol ekstraktının test edilen dört bakteri üzerine MİK değerleri (Stafford et al.,2005- değiştirilmiş)

Bakteri türü	MİK değerleri (mg/mL)			
	Taze	90 gün	1yıl	5yıl
<i>Bacillus subtilis</i>	1.56	0.78	ad ^a	ad
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.56	1.56	ad	ad
<i>E. coli</i>	1.56	0.78	ad	ad
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.56	1.56	ad	ad

^a aktif değil.

Helichrysum türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine yapılan pek çok çalışma olmasına rağmen, bu antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bileşenler yalnızca birkaç çalışmada tanımlanmıştır (Afolayan and Meyer, 1997).

Dilika et al. (2000) yaptıkları araştırmada *H. pedunculatum* yaprakları diklorometan ekstraktının, antibakteriyel aktivite güdümlü, fraksiyonlanması sonucunda linoleik ve oleik asit elde etmişlerdir. Test edilen Gram-pozitif bakteri türleri için çalışma

sonucunda bulunan MİK değerleri 0.01-1.0 mg/mL aralığında değişmektedir. Oleik asit beş Gram-pozitif bakteri türünden üçü üzerinde etkili bulunurken her iki bileşen de Gram-negatif bakteriler üzerine etkili bulunmamıştır. İki yağ asiti arasında *Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus kristinae* karşısında sinerjist bir etki belirlenmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan bakteriler ve bulgular Çizelge 2.7' da belirtilmiştir.

Çizelge 2.7: *H. pedunculatum*' dan izole edilen oleik ve linoleik asidin antibakteriyel aktivitesi (MİK mg/mL) (Dilika et al., 2000)

Bakteri	Gram+/-	Linoleik asit	Oleik asit
<i>Bacillus cereus</i>	+	0.01	ad ^a
<i>B. pumilus</i>	+	1.0	ad
<i>B. subtilis</i>	+	0.01	1.0
<i>Micrococcus kristinae</i>	+	1.0	1.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	1.0	1.0
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	ad	ad
<i>E. coli</i>	-	ad	ad
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ad	ad
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ad	ad
<i>Serratia marcescens</i>	-	ad	ad

^a Aktif değil.

Mathekga et al. (2000) yaptıkları çalışmada, Güney Afrika *Helichrysum* türlerinin tıbbi potansiyelinin araştırıldığı bir program dahilinde, *H. caespitium* (DC.) Harv. türünün olası biyolojik aktivitesini incelemişlerdir. Araştırma dahilinde antibakteriyel etkisi incelenen bileşenler HPLC ile saf halde elde edilip NMR analizi ile doğrulanmıştır. Daha önce bu türden elde edilen caespitin (1. bileşen) bileşeninin antimikrobiyal aktivitesi olduğu gösterilmiştir. *H. caespitium*' un kapitulum kısımlarının aseton ekstraktının antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonundan yeni bir floroglusinol türevi, 2-metil-4-[2', 4', 6'-trihidroksi-3'-(3_metil-propanil)-fenil]but-2-enil asetat (2. bileşen), izole edilmiştir. 2. bileşenin yapılan incelemelerde kullanılan 10 bakteriden Gram-pozitif bakteriler üzerinde önemli derece biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca denemede kullanılan 6 küf türünün gelişiminin de düşük MİK değerlerinde inhibe olduğu belirtilmektedir (Çizelge 2.8 ve Çizelge 2.9).

Çizelge 2.8: *Helichrysum caespitium* kapitulum kısımlarının ham aseton ekstraktının ve 2. bileşenin antibakteriyal aktivitesi (Mathekga et al., 2000).

Bakteri türü:	Gram (+/-)	MİK	
		Ham ekstrakt (mg/mL)	2.bileşen (µg/mL)
<i>Bacillus cereus</i>	+	1.0	0.5
<i>B. pumilus</i>	+	1.0	0.5
<i>B.subtilis</i>	+	1.0	0.5
<i>Micrococcus kristinae</i>	+	1.0	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	1.0	0.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	1.0	ad ^a
<i>E. coli</i>	-	1.0	ad
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ad	ad
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1.0	ad
<i>Serratia marcescens</i>	-	ad	ad

^a Aktif değil

Çizelge 2.9: *Helichrysum caespitium* kapitulum kısımlarının ham aseton ekstraktının ve 2. bileşenin antifungal aktivitesi (Mathekga et al., 2000).

Fungal türler	MİK	
	Ham ekstrakt (mg/mL)	2.bileşen (µg/mL)
<i>Aspergillus flavus</i>	1.0	1.0
<i>A. niger</i>	0.01	1.0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.01	5.0
<i>C. cucumerinum</i>	0.01	0.5
<i>C. sphaerospermum</i>	0.01	0.5
<i>Phytophthora capsici</i>	1.0	1.0

Bougatsos et al. (2003) *H. kraussi* ve *H. rugulosum* türlerinin esansiyel yağları ve ana bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve elde edilen MİK değerleri Çizelge 2.10' da verilmektedir. Çalışma sonucunda her iki türden elde edilen esansiyel yağların da inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir.

Çizelge 2.10: *Helichrysum kraussi* ve *H. rugulosum* türlerinin esansiyel yağları ve ana bileşenlerinin antimikrobiyal etkisi (MİK mg/mL) (Bougratsos et al., 2003).

Esansiyel yağlar	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f	7 ^g	8 ^h	9 ⁱ
<i>Helichrysum kraussi</i>	0.40	0.33	1.60	3.42	>6.40	>6.40	-	-	-
<i>H. rugulosum</i>	0.38	0.25	0.87	2.25	4.70	5.30	-	-	-
α-pinene	7.50	9.50	6	15	8	2	4	4	2
β-caryophyllene	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
β-caryophyllene oxide	0.073	0.90	0.87	1.23	2.43	>6.40	-	-	-
Intraconazole	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³
5-fluocytocine	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³
Amphotericin	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
Netilmicin	4x10 ⁻³	4x10 ⁻³	8.8x10 ⁻³	8x10 ⁻³	8x10 ⁻³	10x10 ⁻³	-	-	-
Amoxicillin with clavulanic acid	3x10 ⁻³	3x10 ⁻³	3.1x10 ⁻³	4x10 ⁻³	5x10 ⁻³	5x10 ⁻³	-	-	-

^a *Staphylococcus aureus*, ^b *Staphylococcus epidermidis*, ^c *Pseudomonas aeruginosa*, ^d *Enterobacter cloacae*, ^e *Klebsiella pneumoniae*, ^f *E. coli*, ^g *Candida albina*, ^h *Candida tropicalis*, ⁱ *Candida glabrata*.

Sağdıç et al. (2002) yaptıkları çalışmada, Türkiye 'ye özgü yerel bir tür olan *Helichrysum compactum* Boiss. bitkisinin metanol ekstraktının %0,5, 1, 1,5 ve 2 konsantrasyonlarını kullanarak *E.coli* O157:H7 karşısındaki etkisini bir haftalık bir süreç boyunca incelemiştir. Çalışma sonucunda bitki ekstraktının %1,5 ve 2 konsantrasyonlarının 2 ve 7. günlerde *E. coli* O157:H7 karşısında inhibitör etki gösterdiği, bunun haricinde bitki ekstraktının bakteri gelişimini önemli düzeyde teşvik ettiği belirtilmektedir.

Helichrysum plicatum DC. subsp. *plicatum* bitkisine dair antimikrobiyal etki çalışmaları literatürde bulunmasına rağmen bu suşun *E. coli* O157:H7 üzerine etkisi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Erdoğan et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisinin *E. coli* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarında, bitkinin yaprak ve gövde kısmının etil asetat ekstraktının, çiçek kısmının etil asetat ekstraktının, yaprak ve gövde kısmının kloroform ekstraktının, çiçek kısmının kloroform ekstraktının, çiçek kısmının metanol ekstraktının ve yaprak ve gövde kısmının aseton ekstraktının *E. coli* karşısında antibakteriyel etkisi olduğu ancak yaprak ve gövde kısmının metanol ekstraktının ve çiçek kısmının aseton ekstraktının bakteri karşısında etki göstermediği belirtilmiştir.

2.2.3. *Helichrysum* türlerinin antioksidan etkileri

Flavonoidler, bitkilerde en yaygın rastlanan ve farklı biyolojik ve farmakolojik etkiler gösteren fenolik gruplardan biridir. Bazı bitkilerin, fenolik yapıları nedeniyle, antioksidan özellik gösterdikleri ve serbest radikal tepkimelerini durdurdukları bilinmektedir (Czinner et al., 2000).

Serbest radikaller ve yağ peroksidasyonunun pek çok patolojik durumda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Sentetik antioksidanların serbest radikal hasarının önlenmesinde kullanılması ile bazı toksik etkiler söz konusu olabilmektedir (Czinner et al., 2000).

Serbest radikallerin genel olarak doku hasarının yayılmasına ve patolojik olaylara neden olduğu görüşü kabul edilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri içeren lipidler moleküler oksijen ile kolaylıkla okside olur ve bu tip oksidasyon serbest radikal zinciri reaksiyonu ile hız kazanmaktadır. Oksijen ortamda fazla miktarda bulunduğu ya da reaktif oksijen türleri varlığında süperoksit anyonlar, hidroksil radikaller ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bu tip radikallerin, gıda bozulmasına, organizma yaşlanmasına ve kanser gelişimine yol açan lipid peroksidasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin ayrıca astım, iltihap, eklem iltihabı, nörodejenerasyonu, Parkinson hastalığı, mongolizm ve muhtemelen bunama ile ilintili olduğuna dair bilgiler vardır. Antioksidanlar lipid peroksidasyonunu ve diğer serbest radikal içeren işlemleri inhibe ederek insan vücudunun radikal reaksiyonları ile ilintili pek çok hastalıktan korunmasını sağlamaktadır (Tepe et al., 2005).

Flavonoidler düşük molekül ağırlıklı maddelerdir ve damarlı bitkilerin tümünde bulunur. Temel flavonoid yapısı A, B, C şeklinde adlandırılmış üç halkadan oluşan 15 karbon atomu içerir. Flavonoidler; 4 numaralı karbon atomu üzerinde bir oksoz grubu bulunması, 2. ve 3. karbon atomları arasında bir çift bağ bulunması ya da karbon halkasında 3. C atomunda bir hidroksil grubu içermesi kriterlerine göre kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadırlar (Sala et al., 2003).

Flavonoidler, bitkilerdeki fizyolojik rollerinden başka anti-enflamatuvar, antioksidan, anti-alerjik, anti-hepatit, anti-trombotik, anti-viral ve anti-kanserojenik aktiviteleri ile de bilinirler. Bu maddelerin dikkat çekici biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri

farklı memeli bağıışıklık sistemleri ile açıklanmaktadır. Bu aktiviteler pek çok flavonoidin gösterdiği antioksidan aktivite ile açıklanmaktadır. Bunların antioksidan mekanizması reaktif oksijen türlerinin oluşumunda rol alan enzimlerin (ksantin oksidaz, protein kinaz C, lipoksigenaz, siklooksigenaz, NADH oksidaz, vb.) inhibasyonunu ya da serbest radikal oluşumunun muhtemel tetikleyicisi iz elementlerin (serbest demir veya bakır) kelatlaşmasını içermektedir (Sala et al ., 2003).

Asteraceae familyası üyelerinden *Helichrysum* cinsine dahil olan türler, başlıca antimikrobiyal, anti-enflamatuvar, sindirim kolaylaştırıcı, safra artırıcı etkileri için halk ilacı olarak kullanılırlar. Pek çok türünün çay halinde ya da pirince, sebzelere ve ordövr tabaklarına eklenen yemeklik baharatlar olarak kullanımları da mevcuttur. Bu türler triterpenoidler, steroidler, flavonoidler, hidroksi-izopentil asetofenon ve floroglusinollerini içerir. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*, en zengin flavonoid içeren *Helichrysum* türlerinden biridir. Bitki içeriğinin % 4,83'ü Helichrysin A ve B, apigenin, naringenin, isoastragalin ve isosalopurposit flavonoidlerinden oluştuğu bildirilmektedir (Erdoğrul et al., 2001).

Flavonlar, flavonoller, flavanonlar ve kalkonlar içeren pek çok *Helichrysum* türlerinin flavonoid aglikonları da içerdiği belirtilmektedir (Wollenweber et al., 1998). Bitkinin kimyasal bileşenlerinden (flavonoidler, kumarinler, fitalitler, α -piron türevleri, terpenoidler, esansiyel yağlar, uçucu asitler ve yağ asitler) en önemlisi içeriğindeki flavonoidlerdir. Ham ilaçların tedavi edici etkisi muhtemelen öncelikle bu bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Czinner et al., 2000).

2.3. Atomik Kuvvet Mikroskopu

Biyoloji, tıp ve ilgili bilim dallarının çalışmalarının temel unsurlarından biri olarak mikroskop günümüzde önemi korumaktadır. İlk basit ışık mikroskopunun, 1668 yılında Antony van Leewenhoek isimli Hollandalı bir araştırmacı tarafından, icat edilmesi bilimsel ilerlemede gerçek bir atılım olmuştur. Basit ışık mikroskopunun kullanımı çok yüksek nitelikli konveks cam merceklere dayandığından, ışık ışınlarının yaklaşık 0.2 μm ' ye karşılık gelen kırınım limiti, mikroorganizmaların bazı yapılarının gösterilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu durum araştırmacıların mikroskopik incelemelerde yeni arayışlar içine girmesine neden olmuştur.

Bu arayışlar sonucunda, 1933 yılında, elektron demetinin incelenen örneğin içinden geçerek görüntü oluşturması prensibine dayanan ilk elektron mikroskobu, Transmisyon Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope-TEM) geliştirilerek hücre yapılarının görüntülenmesi sağlanmıştır. 1942 yılında ise, cisimlerin yüzeylerini incelemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM)' nun icadı ile yüzey morfolojisi analizlerinde ikinci bir atılım gerçekleşmiştir. Örneklerin incelenmesinde ışık (foton) ve cam lenslerin yerini elektronlar ve elektromanyetik lensler almıştır. Ancak, yüksek akımlı elektronların kısa dalga boyuna sahip olmalarına karşın, yüksek vakuma ihtiyaç duymaları ve dolayısıyla incelenen örneğe zarar verebilmeleri elektron mikroskoplarının kullanımını sınırlandırmıştır (Braga, 2000b).

Binning ve Rohrer tarafından, 1982 yılında, ilk taramalı sonda mikroskobu olan Taramalı Tünelleme Mikroskobu (Scanning Tunneling Microscope-STM)' nun geliştirilmesinden itibaren scanning-probe mikroskop kullanımı artmıştır. (Braga, 2000b).

Optik ve taramalı elektron mikroskopları; örnek ve görüntü alınan nokta arasındaki mesafe, içeriğindeki foton ve elektronların dalga boyu ile karşılaştırıldığında, uzun olduğu için “uzak-alan mikroskopları” olarak sınıflandırılırlar. Bu durumda görüntü sapma bölgesindedir ve çözünürlüğü dalga boyu ile sınırlandırılır. Taramalı sonda mikroskopları ise “yakın alan mikroskobu” kavramı bazında çalışmaktadır. Bu kavram doğrultusunda, sonda örneğin hemen yakınına (genellikle birkaç nanometre yakınına) yerleştirildiği için kullanılmakta olan mikroskoplarda karşılaşılan sapma ilintili çözünürlük kısıtlanması sorunu aşılmaktadır. STM, atomik kuvvetler (yaklaşık 10^{-9} Newton) arasında etkileşimler içerdiği için genellikle “atomik kuvvet mikroskobu-AKM (Atomic Force Microscope) olarak adlandırılmaktadır. AKM, scanning-probe mikroskoplarının kullanım alanını genişleten, biyolojik bir örneğin yüzey morfolojisinin yüksek çözünürlükle incelenmesine olanak tanıyan, yeni geliştirilmiş bir tekniktir (Kirby et al., 1995; Robichon et al., 1999; Braga and Ricci, 2000a; 2000b;1998; Santos and Castanho, 2004).

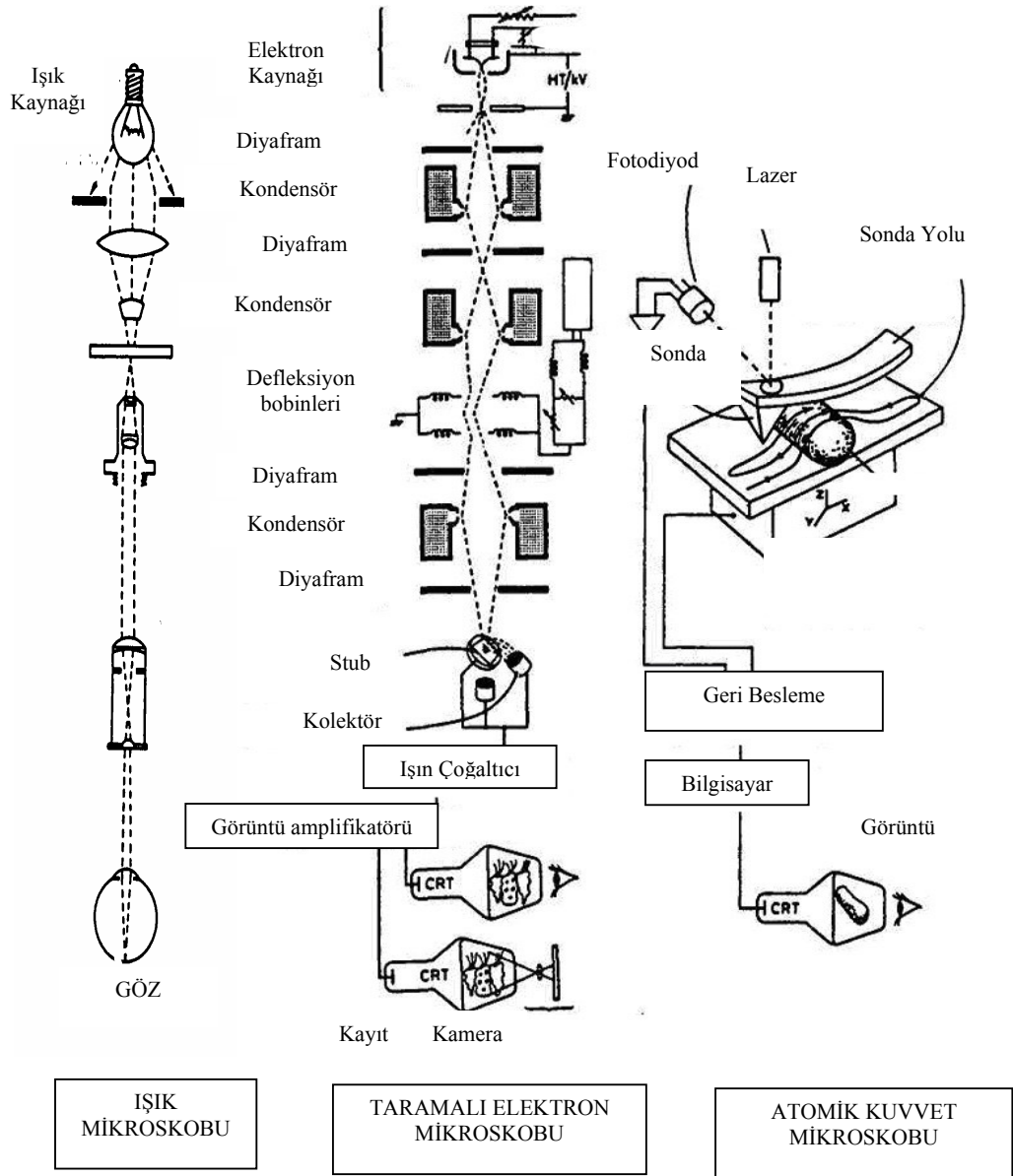
Taramalı sonda mikroskoplarında, 1-2 μ m uzunluğundaki sonda örnek yüzeyi üzerinde hareket ederken, yüzeyde bulunan mikroskobik boyuttaki girinti ve

çıkıntıları algılamaktadır. Sondanın, piezzo elektrik kristalleri aracılığıyla sağlanan, x, y, z eksenleri yönünde örnek yüzeyine bağlı olarak yaptığı hareketler, üç boyutlu görüntünün işlendiği bilgisayara sinyal olarak gönderilir (Mercanoğlu, 2002).

AKM ile inceleme yapılırken sonda örnek yüzeyine yaklaştırıldığı zaman, ilk olarak, uzak etkileşim kuvvetleri olan Van der Waals kuvvetleri etkin olmaktadır. Sondanın daha da yaklaştırılması ile, sonda ve örnek yüzeyindeki atom orbitallerindeki elektronların neden olduğu atomik kuvvetler etkin olmaya başlamaktadır (Mercanoğlu, 2002).

Braga et al. (1998), yaptıkları çalışmada; AKM ile, diğer mikroskop türlerinde genellikle pürüzsüz görünen, bakteri hücre çeperi yüzey özelliklerinin pürüzlülük yapısının gerçeğe uygun şekilde yansıtıldığı belirtilmektedir. Bu şekilde MİK değerinin altındaki dozajlarda antimikrobiyal madde ile etkileşen mikroorganizmaların hasarlanma süreçlerinin takip edilebileceği belirtilmektedir.

AKM topografik görüntüleri ile yüzey pürüzlülüğü görsel olarak algılanabileceği gibi, görüntü alınan yüzeylerin kesit alanlarının yükseklik ve uzunluk ölçümleri boyut analizleri ile de ifade edilebilmektedir (Braga et al., 1998).



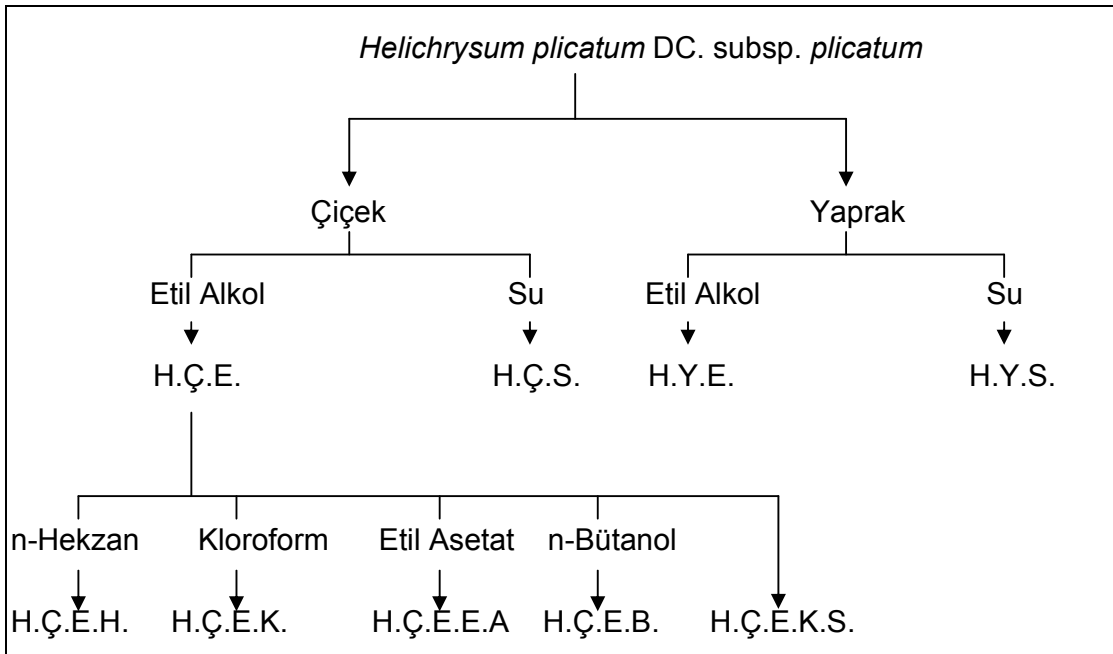
Şekil.2.3. Işık Mikroskobu, SEM ve AKM şematik gösterimi (Braga and Ricci, 2000b)

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki örnekleri

Çalışmada kullanılan *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisinin ekstraktları ve alt fraksiyonları, “Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdem Yeşilada, Ankara, Türkiye” den temin edilmiştir. Kullanılan bitki materyalleri *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının, etil alkol ve su ile ekstraksiyonundan elde edilen: *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* Çiçek Etanol (H.Ç.E.), *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* Yaprak Etanol (H.Y.E.), *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* Çiçek Su (H.Ç.S.), *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* Yaprak Su (H.Y.S.) ekstraktları; H.Ç.E. ekstraktının n-hekzan, kloroform, etil asetat ve n-bütanol ile ekstraksiyonu sonucu sırasıyla elde edilen H.Ç.E. Hekzan (H.Ç.E.H.), H.Ç.E. Kloroform (H.Ç.E.K.), H.Ç.E. Etil asetat (H.Ç.E.E.A.), H.Ç.E. Bütanol (H.Ç.E.B.) ve H.Ç.E. Kalan Su (H.Ç.E.K.S.) alt fraksiyonlarıdır. Çalışmada bitkiden elde edilen ekstraktlar ve H.Ç.E. ekstraktından elde edilen alt fraksiyonlar besiyerinde son konsantrasyonları %0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 olacak şekilde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktları ve alt fraksiyonları.

3.1.2. Bakteri Kùltürü

E. coli O157:H7 937 kùltürü, "Prof. M.P. Doyle, Georgia Üniversitesi, ABD" den sağlanmıştır.

3.1.3. Dilüsyon sıvısı

Çalışmada Dilüsyon sıvısı olarak kullanılan Serum Fizyolojik çözeltilisinin hazırlanışı Ek 1 bölümünde verilmektedir.

3.1.4. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan Tryptic Soy Broth (TS Broth) ve Agar Agar Merck (Almanya), firmalarından sağlanmıştır. Bu besiyerlerinin hazırlanışları Ek 2 bölümünde verilmiştir.

3.1.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) deney düzeneği

Çalışmada TopoMetrix (ABD) firmasından sağlanan TopoMetrix TMX2000 Explorer ve eğrilik yarıçapı 1000 A° olan standart piramit sonda ucu (TopoMetrix 1520-00) kullanılmıştır.

3.1.6. Santrifüj cihazı

AKM ile görüntü eldesi için preparat hazırlama aşamasında kullanılan santrifüj cihazı Nüve (NF1215) firmasından sağlanmıştır.

3.2. Metot

Çalışmanın ilk bölümü; *H. plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitki ekstraktlarının ve alt fraksiyonlarının 18-24 saatlik *E. coli* O157:H7 (yaklaşık 1×10^9 kob/mL konsantrasyonunda) kültürü üzerine etkisinin tüplü yöntem ile incelenmesini içermektedir.

Çalışmanın ikinci bölümü; *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitki ekstraktlarının ve alt fraksiyonlarının seyreltilmiş (yaklaşık 1×10^5 kob/mL konsantrasyonunda) *E. coli* O157:H7 kültürü üzerine etkisinin tüplü yöntem ile incelenmesini içermektedir.

İlk iki bölümünde elde edilen deney verilerinin istatistiksel analizi yapıp $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ düzeyinde sonuçların anlamlı olup olmadığı incelenmiştir.

Çalışmanın son bölümü ise; 7 gün boyunca bitki ekstraktlarına ve alt fraksiyonlarına maruz kalan *E. coli* O157:H7 kültürünün, AKM ile görüntülenerek incelenmesini kapsamaktadır.

3.2.1. Kültürün hazırlanışı

Buzdolabında saklanan *E. coli* O157:H7 stok kültürü steril Triptik Soy (TS) Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılarak kültür canlandırılmıştır. Canlandırılan *E. coli* O157:H7 kültürünün sayımı, serum fizyolojik çözeltisinde seri dilüsyon metodu ile, TSA besiyerinde yüzeyle sürme yöntemi ile yapılmıştır. Canlandırılan ve aktif hale getirilen kültürden yaklaşık 10^5 ve 10^9 kob/mL olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlanıp bitki ekstraktlarına ve alt fraksiyonlara uygulanmıştır.

3.2.2. Bitki materyallerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitki, Yard. Doç. Dr. Mustafa Aslan tarafından, 25 Temmuz 2002 tarihinde, Erzurum Palandöken Dağı'ndan toplanıp, Çizelge 3.1'de belirtilen tayin anahtarına göre Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda, tayini yapılmıştır. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisi gölgede kurutulup, yaprak ve çiçek olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Ayrılan yaprak ve çiçek kısımları ayrı ayrı havanda ezilerek toz haline getirilmiştir (Aslan, 2000).

Çizelge 3.1. *Helichrysum plicatum* 'un alt türlerinin belirlenmesi için kullanılan tayin anahtarı (Aslan,1994).

1. Gövde yaprakları 4-7 cm boyunda, ,5-2 cm genişliğinde, sarımsı-yeşil; bitki hemen hemen çıplak.....	subsp. <i>polyphyllum</i>
2. Gövde yaprakları 1,5-4 cm boyunda 0,2-0,5 cm genişliğinde beyazımsı, grimsi yeşil; bitki hemen hemen çıplak veya lanat tomentos; involukrum krem rengi.....	subsp. <i>pseudoplicatum</i>
3. Gövde yaprakları 1,5-4 cm boyunda 0,2-0,5 cm genişliğinde beyazımsı, grimsi yeşil; bitki hemen hemen çıplak veya lanat tomentos; involukrum parlak sarı.....	subsp. <i>plicatum</i>

3.2.2.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Toz haline getirilmiş çiçek ve yaprak kısımlar ayrı ayrı %80'lik etil alkol ve su ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 40 °C' de 30' ar dakikalık iki basamak halinde toplam 60 dakikada manyetik karıştırıcı yardımı ile tamamlanmıştır. Her basamak sonrası süzme işlemi uygulanmıştır. Toplanan süzüntüler birleştirilip alçak basınç (0 atm basıncı) altında 40°C sıcaklıkta rotavaporda yoğunlaştırılmıştır. Bu şekilde H.Ç.E., H.Y.E., H.Ç.S., H.Y.S. ekstraktları elde edilmiştir. Ekstraktların elde edilen miktarları tartılıp, tartılan ekstrakt miktarının kurutulmuş toplam bitki miktarına oranlanması ile elde edilen yüzde verim değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan yüzde verim değerleri Şekil 3.2.2.1.'de verilmiştir (Aslan, 2000).

Ekstrakt:	% verim:
H.Ç.E.	19,27
H.Ç.S.	17,47
H.Y.E.	14,77
H.Y.S.	14,94

Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının yüzde verim değerleri.

3.2.2.2. H.Ç.E. fraksiyonlarının hazırlanması

Yapılan denemeler sonucunda antimikrobiyal etki gözlenen H.Ç.E. ekstraktının ileri ekstraksiyonuna devam edilmiştir. Bu amaçla 500 g toz haldeki kurutulmuş çiçek %80'lik etil alkol kullanılarak, 40 °C' de, 24'er saatlik iki basamak halinde toplam 48 saat ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi manyetik karıştırıcı yardımı ile yapılmıştır. Her basamak sonrası süzme işlemi

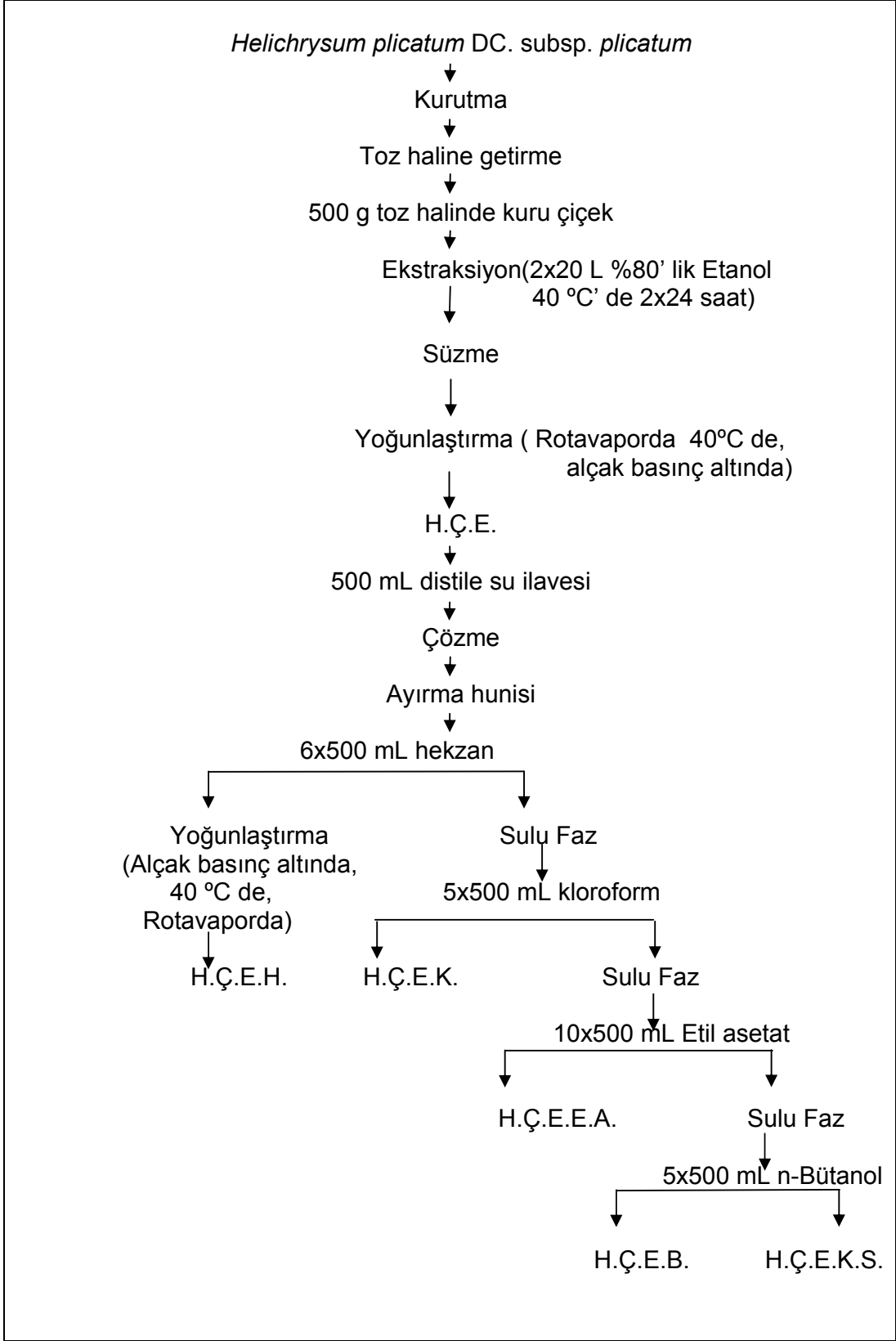
uygulanmıştır. Toplanan süzüntüler birleştirilip alçak basınç (0 atm basıncı) altında 40°C sıcaklıkta rotavaporda yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt kurutulup 500 mL distile suda çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti ayırma hunisine konulmuştur. 6 kez 500 mL hekzan ile ekstraksiyon işlemi sonrası ayırma hunisi yardımıyla hekzan faz ayrılıp 40 °C' de rotavapor kullanılarak yoğunlaştırılmıştır. Bu şekilde H.Ç.E.H. fraksiyonu elde edilmiştir. Kalan sulu faz ayırma hunisine alınarak 5 kez 500 mL kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası kloroform fazı ayrılıp yoğunlaştırılarak H.Ç.E.K. fraksiyonu elde edilmiştir. Kalan sulu faz tekrar ayırma hunisine alınıp 10 kez 500 mL etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetat fazının ayrılıp yoğunlaştırılması sonucunda H.Ç.E.E.A. fraksiyonu elde edilmiştir. Sulu faz bu kez de 500 mL n-Bütanol ile 5 kez ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ayrılan n-bütanol fazının yoğunlaştırılması sonucu H.Ç.E.B. fraksiyonu elde edilmiştir. Geride kalan sulu faz da H.Ç.E.K.S. olarak adlandırılmıştır (Aslan, 2000).

Elde edilen fraksiyon miktarlarının tartım sonuçlarının ekstraksiyon başlangıcında kullanılan H.Ç.E. ekstraktı miktarına oranlanması ile elde edilen % verim değerleri Şekil 3.3' de verilmektedir. Hesaplanan yüzde verim değerleri sonucunda ekstraksiyon işlemi toplam verimi %94,96 olarak belirlenmiştir.

Fraksiyon:	% verim:
H.Ç.E.H.	13,00
H.Ç.E.K.	5,50
H.Ç.E.E.A.	25,39
H.Ç.E.B.	8,51
H.Ç.E.K.S.	42,51

Şekil.3.3. Çalışmada kullanılan H.Ç.E. ileri ekstraktlarının yüzde verim değerleri.

Toz haldeki bitki ekstraktlarının çözdürülmesi amacıyla, ekstrakt miktarıyla orantılı olarak etil alkol kullanılmıştır.



Şekil.3.4. H.Ç.E. ekstraktının ileri ekstraktlarının eldesi.

3.2.3 Antibakteriyel aktivitenin araştırılması

Çalışmada, *H. plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitki ekstraktlarının, *E. coli* O157:H7 kültürü üzerindeki etkisinin görülmesi amacıyla tüplü yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem TS Broth içeren tüplere farklı konsantrasyonlarda bitki ekstraktı ilavesinin ardından *E. coli* O157:H7 inokülasyonunu ve periyodik örnek alımı ile koloni oluşturabilen birim sayısının belirlenmesini içermektedir. Bu amaçla, %0.5, %1.0, %1.5, %2.0 ve %2.5 bitki ekstraktı içeren TS Broth tüplerine %1 oranında *E. coli* O157:H7 inoküle edilip 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyon yapılan gün deneyin 0. günü olarak kabul edilmiştir. Deneyin 1., 2., 4., 5. ve 7. günlerinde her tüpten 1' er mL örnek alımı yapılmıştır (Sağdıç et al., 2002).

H.Ç.E. ekstraktının alt fraksiyonları ile yürütülen çalışmalarda tüplere eklenecek fraksiyon miktarı yüzde verim değerleri üzerinden hesaplanmış ve ekstraktlarla yürütüldüğü şekilde çalışmalar devam ettirilmiştir.

Alınan örneklerin Serum Fizyolojik kullanılarak ardışık dilüsyonları hazırlanıp yayma tekniğine uygun olarak TSA içeren petri kutularına ekim yapılmıştır. Çalışmalar üçlü paraleller halinde yürütülmüştür. 37 °C' de 24 saat inkübasyon sonrasında koloni sayımı yapılmıştır.

Antibakteriyel etkinin araştırılması, çalışma kapsamında iki farklı inokülasyon derişimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan ilk denemelerde 18-24 saatlik kültürden (yaklaşık 1×10^9 kob/mL konsantrasyonunda) doğrudan inokülasyon gerçekleştirilirken, denemelerin ikinci kısmında 18-24 saatlik kültürün ardışık dilüsyonları hazırlanıp yaklaşık 1×10^5 kob/mL konsantrasyonlu dilüsyondan inokülasyon yapılmıştır.

Çalışmada, toz haldeki ekstraktların çözdürülmesi amacıyla eklenen etil alkolden kaynaklanabilecek etkinin belirlenebilmesi için; "kontrol (K)" ve "alkol kontrol (AK)" adı altında iki farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Kontrol grubu, TS Broth ve *E. coli* O157:H7 kültürü içerirken, alkol kontrol grubu bunlara ilaveten en fazla miktarda ekstraktı çözmede kullanılan miktarda etil alkol de içermiştir.

Yapılan çalışmada H.Ç.E.H. VE H.Ç.E.K. denemelerinde faz oluşumunun engellenmesi amacıyla % 0,5 oranında Tween 80 kullanılmıştır. Bu denemelerde kullanılan alkol kontrol grubuna da aynı miktarda Tween 80 eklenmiştir.

3.2.4. AKM ile görüntü eldesi için örnek hazırlama

AKM ile görüntü eldesi için preparatı hazırlanacak olan örneğin 500 µL' si 3 dakika boyunca 5000 rpm' de santrifüjlenmiştir. Çöken kısım 500 µL deiyonize su ile yeniden çözdürülmüştür. Santrifüjleme işleme bu şekilde 5 kez daha tekrarlanarak besiyeri kısmı ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Preparat, en son elde edilen 500 µL'lik deiyonize su içindeki arındırılmış kültür süspansiyonu kullanılarak hazırlanmıştır (Peng et al., 2004).

Preparatların hazırlanması aşamasında; lamlar (AKM cihazında kullanılacak boyutlarda), organik çözücü kullanılarak ultrasonik temizleme cihazında temizlenmiştir. Örnekler, yüzeyleri temizlenmiş lamlar üzerine aktarılmış ve lamlar eğik konumda havada kurumaya bırakılmıştır.

AKM ile inceleme sırasında 100x100 µm² alanda analizler başlatılmış ve alan küçültülmesi ile detaylı görüntü alımına gidilmiştir. Bu sırada sonda ucunun preparatlara uyguladığı kuvvet 1-3 nN ve görüntü çözünürlüğü 400x400 piksel olup, elde edilen veriler bilgisayar yazılımı sayesinde görüntüye çevrilmiştir. Ancak, incelenen alanın küçültülmesi sırasında görüntü kaybı olması nedeniyle her ölçümde aynı oranda yaklaşıma sağlanamamış, görüntüler 5x5 µm² ile 30x30 µm² karasındaki alanlarda kaydedilmiştir.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde; antibakteriyel etki araştırma denemelerinde kullanılan veriler "SPSS 12.0 For Windows" paket programı kullanılarak incelenmiştir.

Bağımsız deneme gruplarının ortalamalarının birbirinden farklılığını tespit etmek amacıyla çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Gruplar ortalamaları arasındaki farklılığın gözlemlenebilmesi amacıyla Genel Doğrusal Model (General Linear Model) /Genel Rastlantı Değişkeni (Univariate)/ Scheffe testi kullanılarak çoklu karşılaştırma testi gerçekleştirilmiştir (Özdamar, 1999).

Çalışma kapsamında etken maddelerin farklı konsantrasyonlarının etkilerini ve zamanın etken maddeler içinde etkisinin gözlemlenebilmesi amacıyla İççe

Faktörlü Denemelerde Varyans Analizi (Nested Design Anova) kullanılmıştır (Özdamar, 1999).

Her bir ekstrakt ve fraksiyon için kendi içinde gün bazında konsantrasyonun etkisi, homojenlik testi uygulandıktan sonra ($p > 0,05$) Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way Anova) Scheffe testi ile gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Antibakteriyel Etki Bulguları

Tez çalışması kapsamında yürütülen antibakteriyel etki araştırma çalışmasında bir hafta boyunca *E. coli* O157:H7 logaritmik sayım sonucu üzerine her bir ekstrakt ve alt fraksiyon için kullanılan konsantrasyonların etkileri grafiğe geçirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen bulgular, inoküle edilen kültür konsantrasyonuna bağlı olarak, iki ana kısımda sunulmaktadır.

4.1.1. 18-24 Saatlik kültür ile yapılan deneme sonuçları

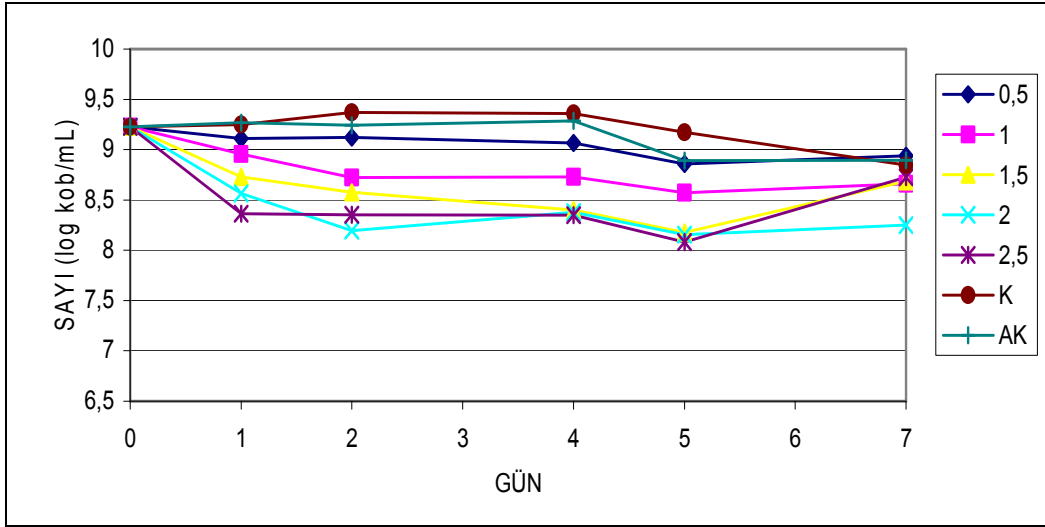
Çalışmanın bu bölümünde, ilk olarak yaklaşık 1×10^9 kob/mL seviyesindeki 18-24 saatlik kültür inokülasyonu üzerine *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisi ekstraktları H.Ç.E., H.Y.E., H.Ç.S. ve H.Y.S.' nin antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Daha sonra gözlenen etki doğrultusunda H.Ç.E. ekstraktının alt fraksiyonları olan H.Ç.E.E.A., H.Ç.E.K., H.Ç.E.H., H.Ç.E.B. ve H.Ç.E.K.S. ile araştırma yürütülmüştür.

4.1.1.1. 18-24 Saatlik kültür ile yapılan ekstrakt çalışmaları sonuçları

H.Ç.E. ekstraktı

H.Ç.E. ekstraktı için yapılan iki çalışmanın ortalama değerleri kullanılarak elde edilen bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1' de gösterilmektedir. Ekstrakt konsantrasyonlarında denemenin 1. gününden itibaren *E. coli* O157:H7 karşısında gözlenen inhibisyon etkisinin deneme süreci boyunca devam ettiği sonuçlarda gözlenmiştir. %0.5 konsantrasyonunda görülen azalma önemli bir inhibisyon etkisi göstermezken ekstraktın diğer konsantrasyonları çalışılan bakteri karşısında deneme süreci boyunca inhibisyon etkisi sağlamıştır. Çalışma sonuçlarında en düşük logaritmik sayımların elde edildiği 5. günde K ve AK gruplarında sırasıyla 9.171239 ve 8.889302 kob/mL sonuçları alınırken %2.0 ve 2.5 konsantrasyonlarında 8.155842 ve 8.0080987 kob/mL sonuçları gözlenmiştir. Son sayım sonuçlarının alındığı 7. günde ise K ve AK grupları için 8.845098 ve 8.89487 kob/mL %2.0 ve %2.5 konsantrasyonları için 8.251638 ve 8.724822 kob/mL logaritmik sonuçları elde edilmiştir. Denemenin son gününde %2.5 konsantrasyonunda gözlenen sapma deney hatası olarak yorumlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin tek yönlü istatistiksel varyans analizi (Scheffe testi)

ile değerlendirme sonuçları da %2.0 ve %2.5 konsantrasyonlarında gözlenen etkinin $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

Çizelge 4.1. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,22574	9,111431	9,120025	9,06477	8,858337	8,938686
%1.0	9,22574	8,955046	8,72071	8,728354	8,572678	8,660233
%1.5	9,22574	8,728354	8,576341	8,400106	8,177055	8,683947
%2.0	9,22574	8,564271	8,19382	8,378398	8,155842	8,251638
%2.5	9,22574	8,361728	8,352825	8,348305	8,080987	8,724822
%K	9,22574	9,251233	9,37076	9,358252	9,171239	8,845098
%AK	9,22574	9,267172	9,24138	9,284431	8,889302	8,89487

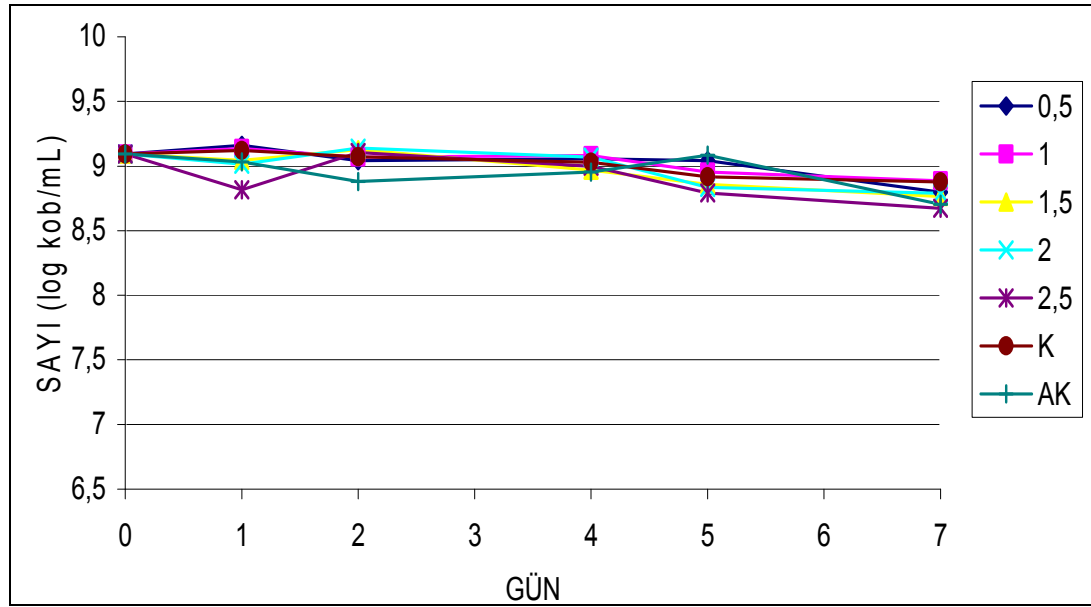
H.Y.E. ekstraktı

H.Y.E. ekstraktı ile yapılan iki çalışmanın ortalama değerleri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2' de verilmektedir. Yapılan çalışma boyunca ekstraktın *E. coli* O157:H7 karşısında antibakteriyel etki sağlamadığı görülmüştür. Nitekim K ve AK grupları için logaritmik sayım sonucu bulguları 5. günde 8.920819 ve 9.116165 kob/mL, 7. günde 9.012134 ve 8.846131 kob/mL iken en yüksek konsantrasyon olan %2.5 konsantrasyonu sayım sonuçları 5. ve 7. günlerde 8.814026 ve 8.673635 kob/mL olarak tespit edilmiştir. H.Y.E. ekstraktına ait etkinin tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları $p < 0,01$ düzeyinde %2.0 ve

2.5 konsantrasyonunda etki olduğunu göstermiştir. Ancak bulunan etki antibakteriyel etki sağlayacak düzeyde yeterli değildir.

Çizelge 4.2. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,118926	9,158865	9,045975	9,061955	9,050509	8,874095
%1.0	9,118926	9,174157	9,079181	9,08398	8,954243	8,909378
%1.5	9,118926	9,045323	9,128722	8,976961	8,858337	8,787697
%2.0	9,118926	9,031408	9,156347	9,070653	8,834633	8,812913
%2.5	9,118926	8,82823	9,106078	9,003604	8,814026	8,673635
%K	9,118926	9,185637	9,091667	9,077368	8,920819	9,012134
%AK	9,118926	9,073107	8,954243	9,010017	9,116165	8,846131



Şekil 4.2. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

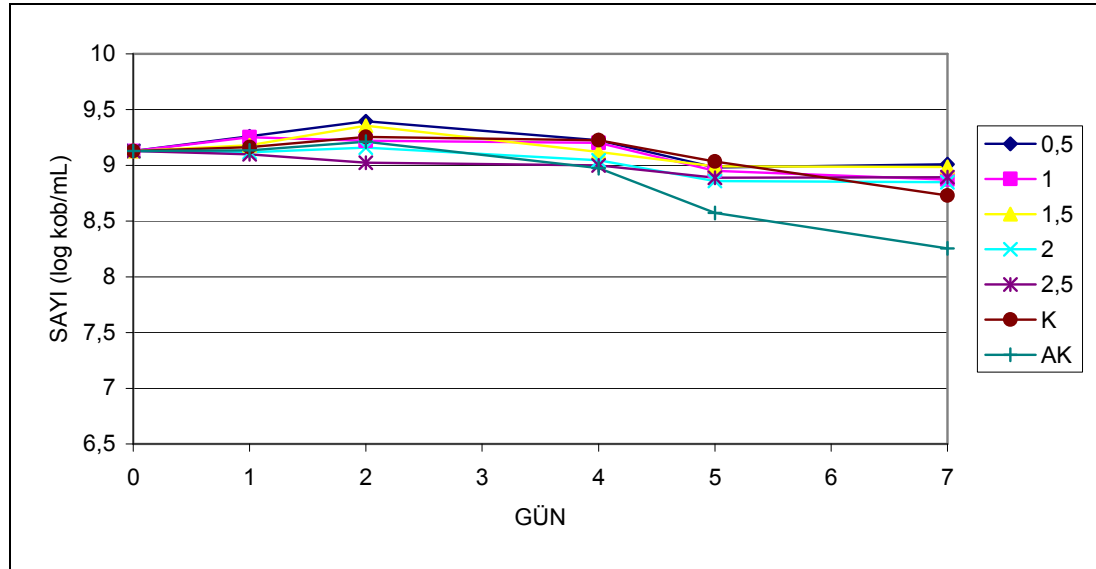
H.Ç.S. ekstraktı

H.Ç.S. ekstraktı için yapılan iki çalışmanın ortalama değerleri kullanılarak elde edilen bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3' de gösterilmektedir. Ekstrakt konsantrasyonlarının deneme sürecinde *E. coli* O157:H7 karşısında inhibisyon etkisi sağlamadığı görülmüştür. Nitekim K ve AK gruplarına ait logaritmik sayım sonuçları denemenin 5. gününde 9.034598 ve 8.573993 kob/mL, 7. gününde ve 8.72947 ve 8.256016 kob/mL iken en yüksek konsantrasyon olan %2.5 ekstrakt konsantrasyonu sayım sonuçları 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.890079 ve 8.89429

kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bu ekstrakt için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da $p < 0,01$ seviyesinde anlamlı bir etki olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.3. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,128479	9,261586	9,397139	9,225644	8,980003	9,010853
%1.0	9,128479	9,252919	9,221671	9,202844	8,950165	8,874197
%1.5	9,128479	9,179424	9,355081	9,119689	8,992086	8,987302
%2.0	9,128479	9,117955	9,159733	9,046795	8,859481	8,849808
%2.5	9,128479	9,100346	9,023884	9,000358	8,890079	8,89429
%K	9,128479	9,165251	9,256299	9,225644	9,034598	8,72947
%AK	9,128479	9,133397	9,211557	8,975118	8,573993	8,256016



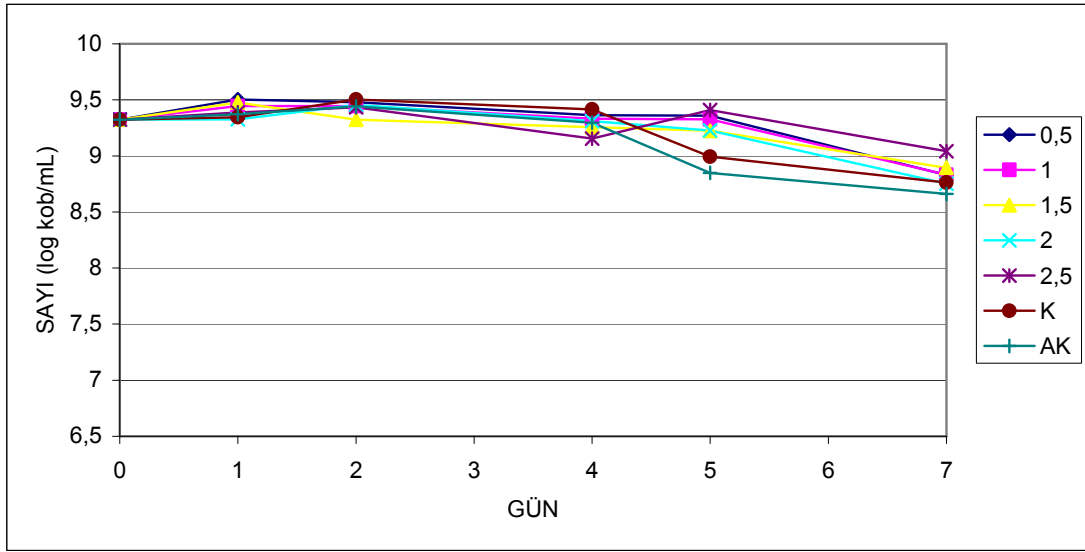
Şekil 4.3. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

H.Y.S. ekstraktı

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4' de H.Y.S. ekstraktı için yapılan iki antibakteriyel etki denemesi ortalamasının sonuçları görülmektedir. Ekstraktın deneme süreci boyunca *E. coli* O157:H7 karşısında bir inhibisyon etkisi göstermediği grafikte görülmektedir. H.Y.S. ekstraktı için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da ekstraktın bakteri karşısında $p=0,05$ düzeyinde anlamlı bir etki göstermediğini işaret etmektedir.

Çizelge 4.4. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,324016	9,503999	9,478322	9,364039	9,359367	8,828825
%1.0	9,324016	9,445159	9,443752	9,332978	9,325081	8,833124
%1.5	9,324016	9,475949	9,324398	9,256132	9,223769	8,894469
%2.0	9,324016	9,327329	9,456308	9,309196	9,22574	8,753027
%2.5	9,324016	9,388507	9,434689	9,15524	9,408719	9,042546
%K	9,324016	9,344165	9,503744	9,414395	8,994457	8,762047
%AK	9,324016	9,3715	9,442249	9,296207	8,847843	8,659588



Şekil 4.4. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

$p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulunan değerler içinde en yüksek etki sağlayan verinin H.Ç.E %2 konsantrasyonuna ait olduğu görülmektedir.

Yaklaşık 1×10^9 kob/mL seviyesindeki 18-24 saatlik kültür ile yürütülen ekstrakt denemelerinde gerek ortalamaları alınan deney verilerinin grafiksel gösterimi gerekse verilerin tek tek istatistiksel analizi *E. coli* O157:H7 karşısında en etkili ekstraktın H.Ç.E. ekstraktı olduğunu göstermektedir. Bitkinin halk arasında şifa amaçlı kullanımında da genel olarak kurutulmuş çiçek kısmından faydalandığı literatürde yer almaktadır (Nostro et al., 2001; Ruberto et al., 2002).

Literatürde *Helichrysum* türü ile yürütülen antibakteriyel etki tespit çalışmalarında genel olarak bitkinin antibakteriyel etkisinin Gram-pozitif bakteriler üzerine olduğu; Gram- negatif karşısında üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyonunun tespit edilemediği belirtilmektedir (Meyer and Afolayan, 1995; Dilika et al., 2000; Mathekga et al., 2000).

Bu kısımda yürütülen çalışmalarda istatistiksel anlamın oluşumunda birbirinden bağımsız ekstrakt, konsantrasyon ve zaman parametrelerinin etkili olup olmadığını görmek amacıyla uygulanan Genel Çizgisel Model/Genel Rastlantı Değişkeni/Scheffe testi sonucunda her üç parametrenin de önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu görülmüştür.

İççe Faktörlü Denemelerde Varyans analizi kullanılarak ekstraktlar bazında konsantrasyonun ve ekstrakt konsantrasyonları içinde zamanın etkisinin önemli ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur (EK 2).

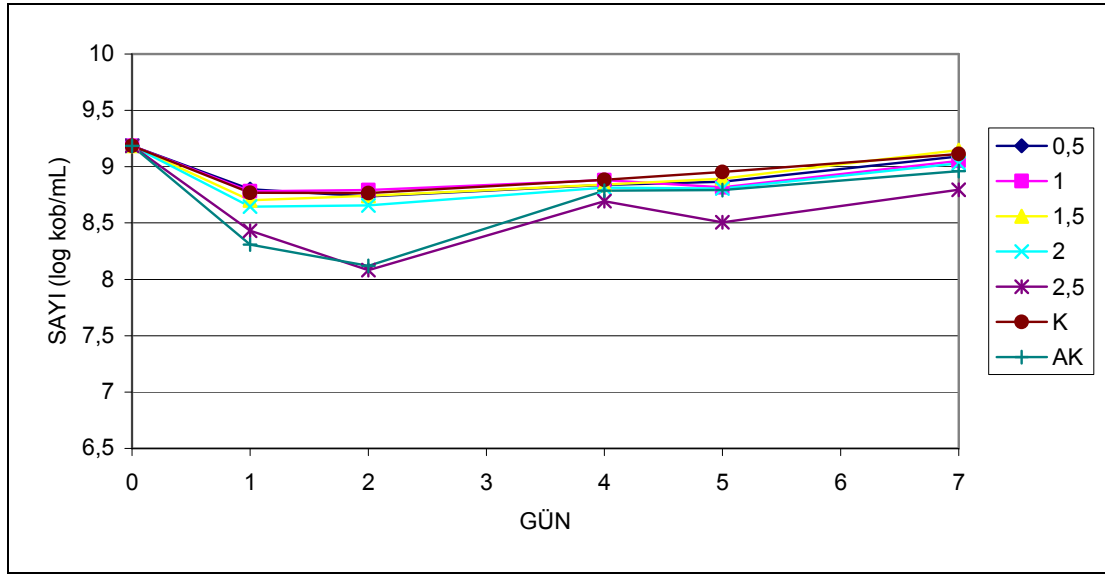
4.1.1.2. 18-24 Saatlik kültür ile yapılan H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonlarının çalışmaları sonuçları

H.Ç.E.K fraksiyonu

Yaklaşık 10^9 kob/mL seviyesindeki 18-24 saatlik kültür inokülasyonu ile gerçekleştirilen antibakteriyel etki çalışmalarının ikinci kısmında yürütülen H.Ç.E. alt fraksiyon denemelerinden H.Ç.E.K. için gerçekleştirilen iki çalışmanın sonuçlarının ortalamaları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5' de gösterilmektedir. Çalışma sonuçlarında fraksiyonun %2.5 konsantrasyonu haricinde *E. coli* O157:H7 karşısında bir etki gözlenmezken, %2.5 konsantrasyonunun özellikle 5. ve 7. günlerde bakteri karşısında nispeten etkili olduğu görülmüştür. Çalışmada K ve AK gruplarına ait logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.952664 ve 8.792838 kob/mL ve 7. günde 9.11274 ve 8.959425 kob/mL iken en yüksek konsantrasyon olan %2.5 konsantrasyonu logaritmik sayım sonuçları 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.507675 ve 8.795605 kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bu fraksiyon için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da 5. ve 7. günlerde %2.5 konsantrasyonunun AK grubuna göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir etki taşıdığını göstermektedir.

Çizelge 4.5. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,186401	8,800474	8,737564	8,837516	8,867	9,091676
%1.0	9,186401	8,781237	8,791876	8,879614	8,816742	9,052379
%1.5	9,186401	8,702643	8,742843	8,840115	8,893303	9,147333
%2.0	9,186401	8,645136	8,655614	8,813557	8,805923	9,031262
%2.5	9,186401	8,43067	8,082611	8,693793	8,507675	8,795605
%K	9,186401	8,767221	8,765716	8,883938	8,952664	9,11274
%AK	9,186401	8,30765	8,1197	8,786274	8,792838	8,959425



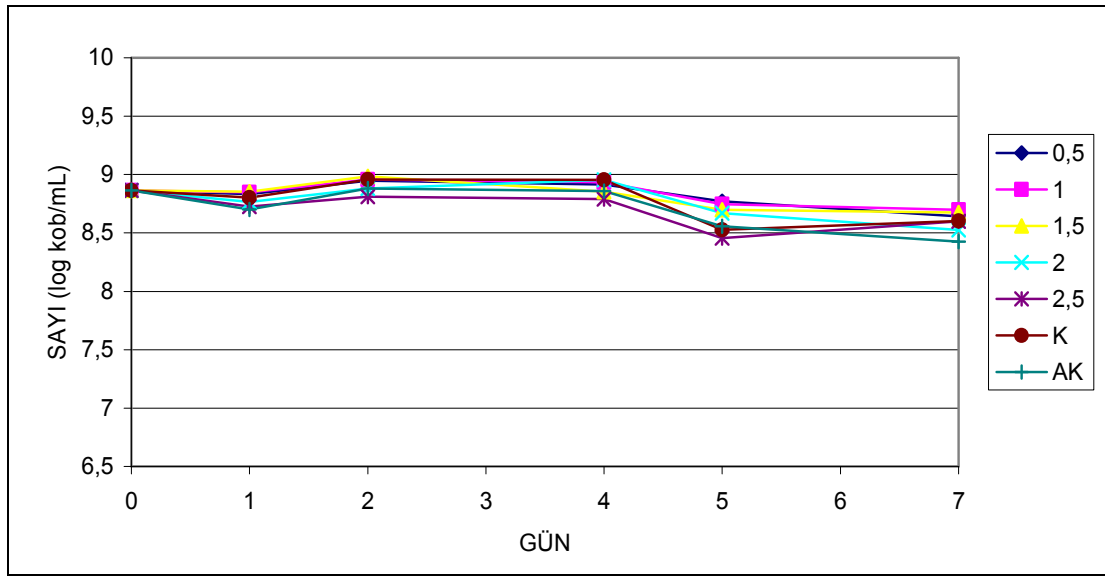
Şekil 4.5. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

H.Ç.E.E.A. fraksiyonu

Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6' da gösterilen H.Ç.E.E.A. fraksiyonu ile yapılan iki çalışmanın ortalama sonuçlarında; *E. coli* O157:H7 karşısında herhangi bir antibakteriyel etki görülmemektedir. K ve AK grupları için elde edilen logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.526559 ve 8.556855 kob/mL ve 7. günde 8.60375 ve 8.42591 kob/mL iken en yüksek konsantrasyon olan %2.5 konsantrasyonu için 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.45454 ve 8.599371 kob/mL sayım sonuçları elde edilmiştir. Bu fraksiyon için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçlarında da fraksiyona dair çalışma verilerinin istatistiksel yönden $p=0,05$ düzeyinde anlam ifade etmediği görülmüştür.

Çizelge 4.6. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	8,863807	8,832399	8,948447	8,916535	8,770065	8,642724
%1.0	8,863807	8,848978	8,957348	8,934981	8,747399	8,699898
%1.5	8,863807	8,852609	8,985622	8,854889	8,698468	8,676018
%2.0	8,863807	8,765455	8,879674	8,955659	8,670308	8,525279
%2.5	8,863807	8,725808	8,811785	8,789536	8,45454	8,599371
%K	8,863807	8,802497	8,959015	8,956223	8,526559	8,60375
%AK	8,863807	8,702607	8,879993	8,858433	8,556855	8,42591



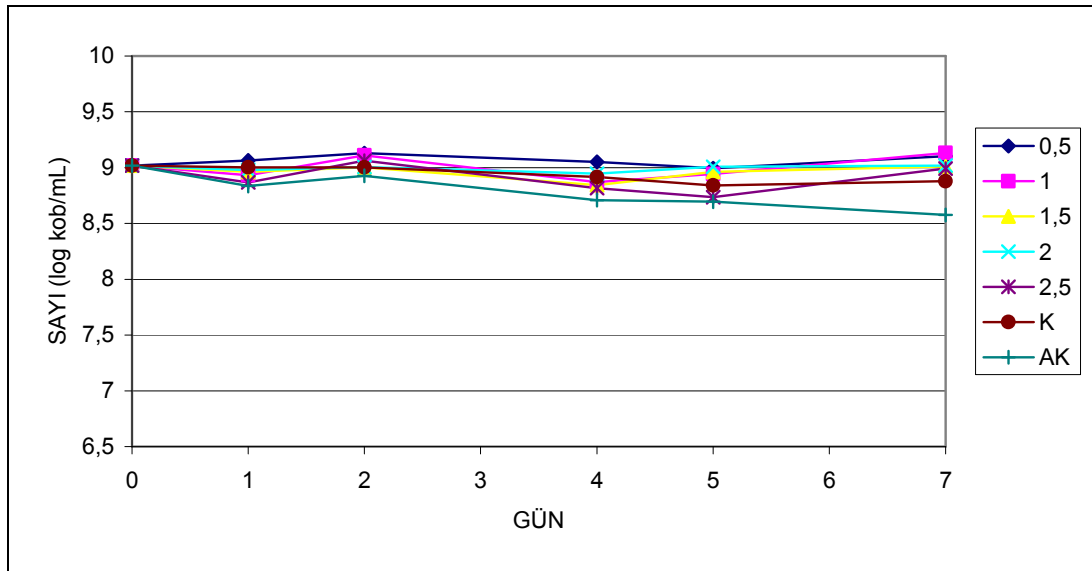
Şekil 4.6. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

H.Ç.E.H. fraksiyonu

H.Ç.E.H. fraksiyonuna ait antibakteriyel etki araştırma sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7' de yer almaktadır. Bu fraksiyonun konsantrasyonları deneme sürecinde *E.coli* O157:H7 karşısında antibakteriyel etki göstermemiştir. Bu çalışmada da K ve AK değerleri için 5. günde 8.840942 ve 8.696065 kob/mL ve 7. günde 8.876987 ve 8.575957 kob/mL logaritmik sayım sonuçları elde edilirken %2.5 konsantrasyonu için 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.735066 ve 8.992701 kob/mL sayım sonuçları elde edilmiştir. Bu fraksiyon için yürütülen çalışmaya ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme bulguları da deneme için $p=0,05$ düzeyinde anlamlı etki olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.7. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,018423	9,064458	9,130334	9,050509	8,99417	9,102662
%1.0	9,018423	8,932812	9,11059	8,871184	8,942834	9,131405
%1.5	9,018423	8,960629	9,002166	8,843025	8,962211	9,011429
%2.0	9,018423	8,977724	9,004321	8,944483	9,0086	9,018423
%2.5	9,018423	8,867271	9,061955	8,817345	8,735066	8,992701
%K	9,018423	9,002886	9,001445	8,91733	8,840942	8,876987
%AK	9,018423	8,834633	8,925999	8,70757	8,696065	8,575957



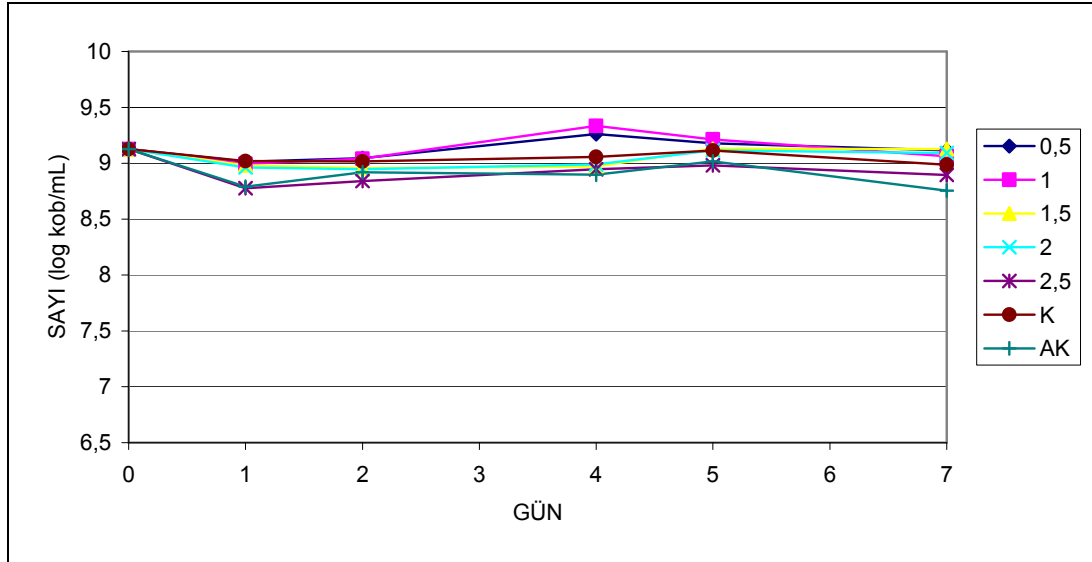
Şekil 4.7. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

H.Ç.E.B. fraksiyonu

Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8' de yer verilen H.Ç.E.B. fraksiyonuna dair çalışma sonuçlarında fraksiyonun konsantrasyonlarının deneme sürecinde *E.coli* O157:H7 karşısında antibakteriyel etki göstermediği görülmektedir. K ve AK grupları için elde edilen logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.526559 ve 8.556855 kob/mL ve 7. günde 8.60375 ve 8.42591 kob/mL iken fraksiyonun %2.5 konsantrasyonu için 5. ve 7. günlerde 8.45454 ve 8.599371 kob/mL logaritmik sayım sonucu değerleri elde edilmiştir. Bu fraksiyon için yürütülen çalışmaya ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme bulguları da deneme için $p=0,05$ düzeyinde anlamlı etki olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.8. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,126023	8,832399	8,948447	8,916535	8,770065	8,642724
%1.0	8,863807	8,848978	8,957348	8,934981	8,747399	8,699898
%1.5	8,863807	8,852609	8,985622	8,854889	8,698468	8,676018
%2.0	8,863807	8,765455	8,879674	8,955659	8,670308	8,525279
%2.5	8,863807	8,725808	8,811785	8,789536	8,45454	8,599371
%K	8,863807	8,802497	8,959015	8,956223	8,526559	8,60375
%AK	8,863807	8,702607	8,879993	8,858433	8,556855	8,42591



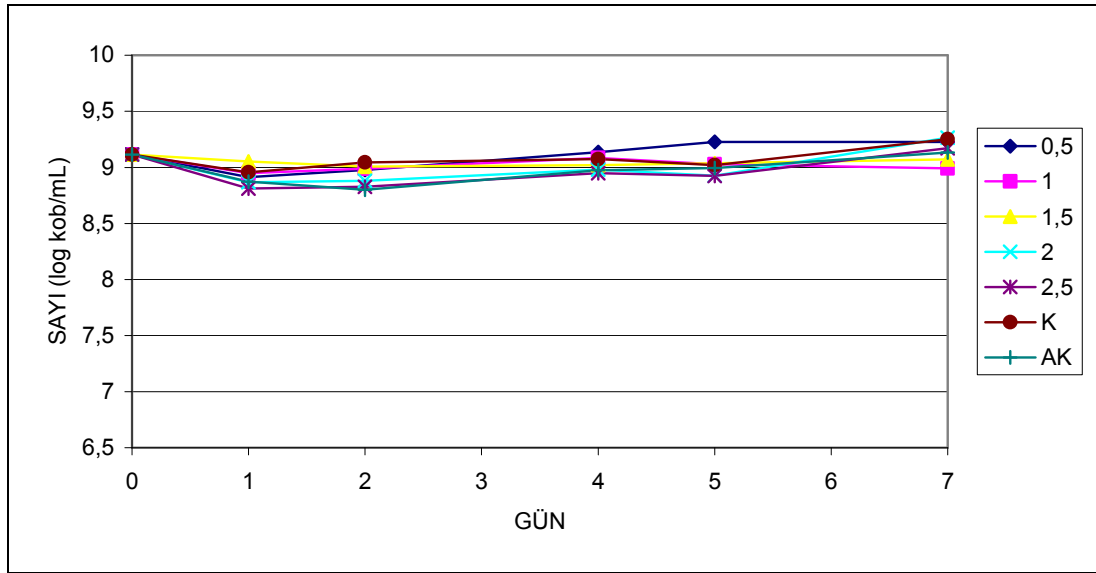
Şekil 4.8. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

H.Ç.E.K.S. fraksiyonu

H.Ç.E.K.S. fraksiyonu ile yapılan antibakteriyel deneme sonuçları Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9' da gösterilmektedir. Çalışma sonuçları fraksiyonuna ait konsantrasyonlarının, deneme sürecinde, *E. coli* O157:H7 karşısında bir inhibisyon etkisi göstermediğini işaret etmektedir. Bu çalışmada da K ve AK gruplarına ait logaritmik sayım sonucu değerleri 5. günde 9.019808 ve 8.992701 kob/mL ve 7. günde 9.251233 ve 9.133539 kob/mL iken %2.5 konsantrasyonu 5. ve 7. gün değerleri 8.924279 ve 9.170262 kob/mL olarak tespit edilmiştir. H.Ç.E.K.S. fraksiyonu için yürütülen çalışmaya ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da deneme için $p=0,05$ düzeyinde anlamlı etki olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.9. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S. fraksiyonu antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	9,115056	8,913814	8,976197	9,135663	9,227029	9,227887
%1.0	9,115056	8,94776	8,988262	9,08398	9,028029	8,989746
%1.5	9,115056	9,051795	9,005752	9,019808	9,036096	9,070653
%2.0	9,115056	8,867271	8,880814	8,979245	8,927712	9,265604
%2.5	9,115056	8,81068	8,826075	8,94776	8,924279	9,170262
%K	9,115056	8,955848	9,044017	9,073107	9,019808	9,251233
%AK	9,115056	8,873127	8,799341	8,974665	8,992701	9,133539



Şekil 4.9. 18-24 saatlik kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

Yaklaşık 10^9 kob/mL seviyesindeki 18-24 saatlik kültür ile yürütülen H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonları denemelerinde gerek ortalamaları alınan deney verilerinin grafiksel gösterimi gerekse verilerin tek tek analizi *E. coli* O157:H7 karşısında etkisi araştırılan fraksiyonlar içinde H.Ç.E.K. fraksiyonunun kısmen etkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu etki mikrobiyal gelişmeyi engelleme açısından yeterince önemli değildir. H.Ç.E. ekstraktının gösterdiği etkinin alt fraksiyonlarındakinden daha yüksek olması bakteri karşısında etki eden maddenin tek bir alt fraksiyonda toplanmamış olduğunu düşündürmektedir.

Bu kısımda yürütülen çalışmalarda istatistiksel anlamın oluşumunda birbirinden bağımsız ekstrakt, konsantrasyon ve zaman parametrelerinin etkili olup olmadığını görmek amacıyla uygulanan Genel Çizgisel Model/Genel Rastlantı

Değişkeni/Scheffe testi sonucunda her üç parametrenin de önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu görülmüştür.

İçişçe Faktörlü Denemelerde Varyans analizi kullanılarak ekstraktlar bazında konsantrasyonun ve ekstrakt konsantrasyonları içinde zamanın etkisinin önemli ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur (EK 2).

4.1.2. Seyreltilmiş Kültür İle Yapılan Deneme Sonuçları

Yeşil Çay kateşinlerinin *E. coli* O157:H7 üzerinde antibakteriyel etkisi araştırılırken başlangıç inokülasyon sayısındaki artışın etki kaybına neden olduğu belirtilmiştir (Juneja et al., 2000). Çalışmada kültür konsantrasyonunun antibakteriyel etki üzerinde değişim yaratıp yaratmayacağını gözlemlemek amacıyla 18-24 saatlik kültürün seri dilüsyonları hazırlanmış ve inokülasyonda yaklaşık 10^5 kob/mL seviyesindeki seyreltilmiş kültür kullanılarak denemeler tekrarlanmıştır. Çalışmanın bu kısmında tüm ekstraktlar ve fraksiyonlar için ikişer deneme yapıp ortalama değerleri grafiğe aktarılmıştır.

Çalışmanın ilk kısmında *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisi ekstraktları H.Ç.E., H.Y.E., H.Ç.S. ve H.Y.S. üzerinde antibakteriyel etki araştırılmış; daha sonra gözlenen etki doğrultusunda H.Ç.E. ekstraktının alt fraksiyonları olan H.Ç.E.E.A., H.Ç.E.K., H.Ç.E.H., H.Ç.E.B. ve H.Ç.E.K.S. ile araştırma yürütülmüştür.

4.1.2.1. Seyreltilmiş kültür ile yapılan ekstrakt çalışmaları sonuçları

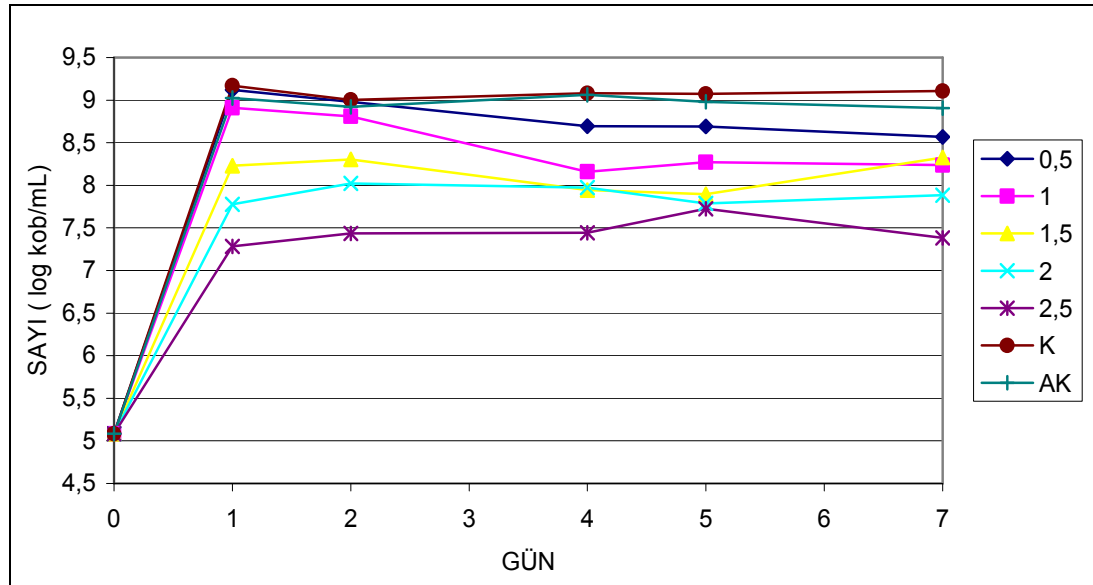
H.Ç.E. ekstraktı

H.Ç.E. ekstraktı ile yapılan antibakteriyel etki belirleme denemesi sonucu Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10' da verilmektedir. Ekstraktın tüm konsantrasyonlarında, *E. coli* O157:H7 karşısında, konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak artan bir inhibisyon etkisi göstermektedir. Yaklaşık 10^5 kob/mL seviyesinde kültür ile yapılan araştırmada etkinin daha belirgin bir şekilde gerçekleştiği grafikte de görülmektedir. K ve AK gruplarının için deneme boyunca logaritmik sayım sonuçları 9.169765 ile 8.905385kob/mL aralığında iken logaritmik sayım sonucu değerinin %0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 konsantrasyonlarında sırasıyla 8.568323, 8.807829, 7.893927, 7.77791 ve 7.280581 kob/mL değerlerine kadar azaldığı görülmüştür. H.Ç.E. ekstraktı ile gerçekleştirilen seyreltilmiş kültür antibakteriyel

etki çalışmasına ait bulguların tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da bulunan etkinin %1 konsantrasyonundan itibaren tüm deneme noktalarında ve %0.5 konsantrasyonunda 5. ve 7. günlerde $p < 0,01$ seviyesinde anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,084687	9,122524	8,981666	8,693624	8,689441	8,568323
%1.0	5,084687	8,908187	8,807829	8,158872	8,27004	8,235499
%1.5	5,084687	8,229047	8,302565	7,944542	7,893927	8,324931
%2.0	5,084687	7,77791	8,021838	7,971409	7,788676	7,885481
%2.5	5,084687	7,280581	7,434252	7,441528	7,724988	7,382196
%K	5,084687	9,169765	9,000578	9,079717	9,073012	9,105958
%AK	5,084687	9,026321	8,920968	9,062686	8,980871	8,905385



Şekil 4.10. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

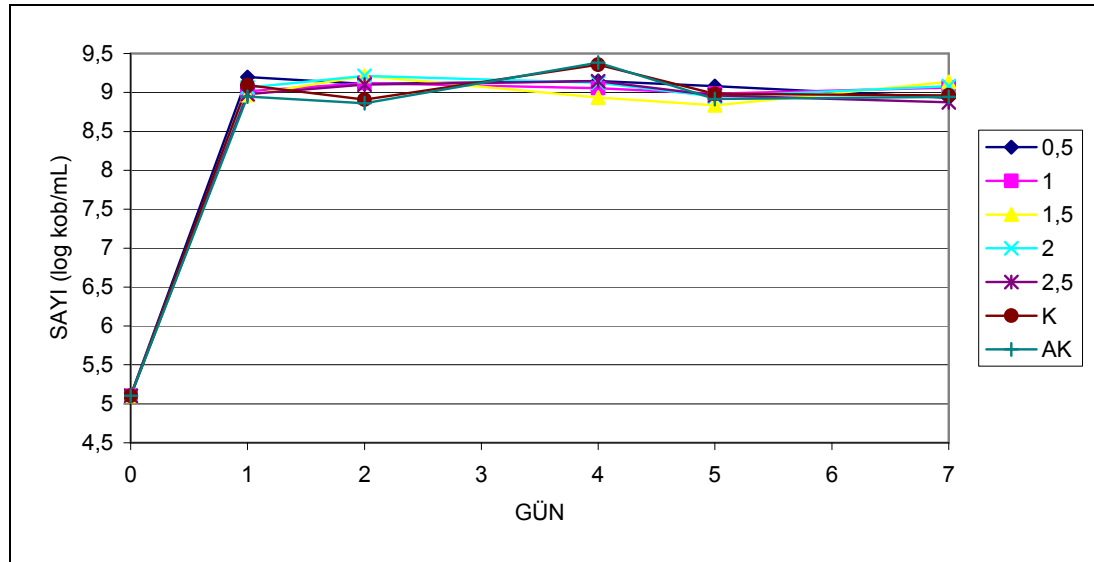
H.Y.E. ekstraktı

H.Y.E. ekstraktı ile yapılan antibakteriyel etki belirleme çalışması sonuçları Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11' de verilmektedir. Deneme sürecinde ekstraktın *E. coli* O157:H7 karşısında etkili olmadığı gözlemlenmiştir. K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.982601 ve 8.917274 kob/mL ve 7. günde 8.961403 ve 8.943245 kob/mL iken en yüksek konsantrasyon olan %2.5 konsantrasyonunun 5. ve 7. günlerdeki logaritmik sayım sonucu değerleri 8.962369 ve 8.872615 kob/mL olarak tespit edilmiştir. H.Y.E. ekstraktı için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü

istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları ekstraktın $p < 0,01$ seviyesinde çalışmanın 4. ve 5. günlerinde anlamlı etkisi olduğunu göstermektedir ancak bu etki mikrobiyal gelişim üzerinde önemli bir etki sağlayacak düzeyde bulunmamıştır.

Çizelge 4.11. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,103545	9,199701	9,108806	9,146593	9,082399	8,930701
%1.0	5,103545	9,015969	9,121105	9,053775	8,986641	9,062647
%1.5	5,103545	8,964973	9,215279	8,937028	8,835267	9,136544
%2.0	5,103545	9,06482	9,213158	9,126321	8,945626	9,08105
%2.5	5,103545	8,97741	9,100941	9,143493	8,962369	8,872615
%K	5,103545	9,093563	8,91021	9,358056	8,982601	8,961403
%AK	5,103545	8,947895	8,863305	9,385585	8,917274	8,943245



Şekil 4.11. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.E. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

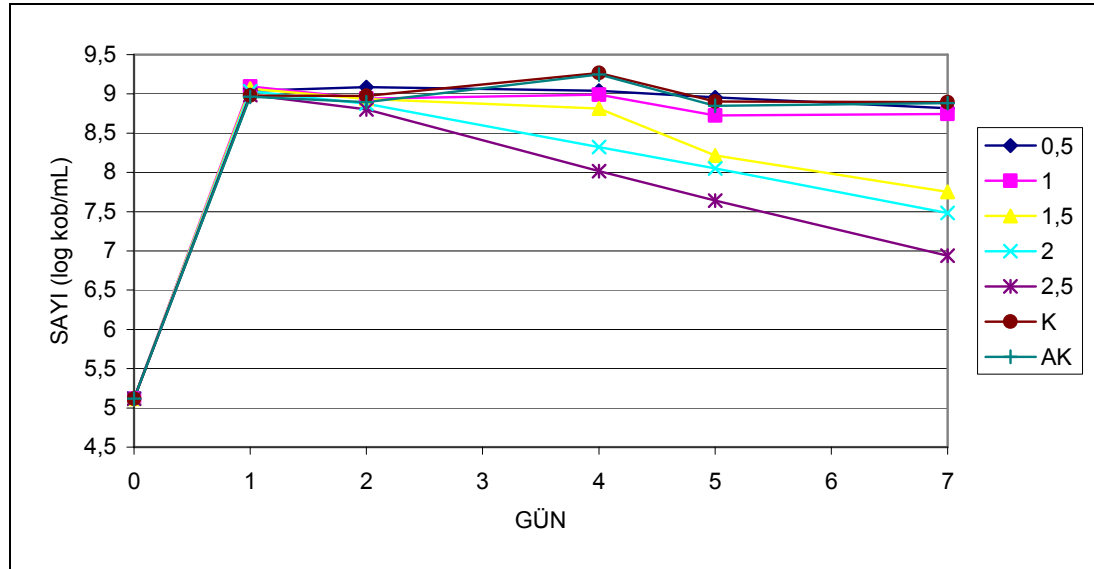
H.Ç.S. ekstraktı

H.Ç.S. ekstraktı ile yapılan çalışma sonuçları Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12' de verilmektedir. Çalışmada ilk iki günde ekstraktın bakteri karşısında etkisi gözlenmezken; ekstraktın %1.5, 2.0 ve 2.5 konsantrasyonlarının denemenin 4. gününden itibaren *E. coli* O157:H7 karşısında, konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak inhibisyon etkisi gösterdiği şekilde görülmektedir. K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonuçları deneme boyunca 9.26707049 ile 8.847741

kob/mL değerleri arasında değişirken %1.5 konsantrasyonunda 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.215145 ve 7.75326 kob/mL, %2.0 konsantrasyonunda 5. ve 7. günlerde 8.048725 ve 7.484086 kob/mL ve %2.5 konsantrasyonunda 5. ve 7. günlerde 7.64155 ve 6.939261 kob/mL seviyelerine kadar sayısal azalma gözlenmiştir. Ekstrakt için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da etki gözlenen konsantrasyonlarda $p < 0,01$ seviyesinde anlamlı bir etki olduğu sonucunu göstermektedir.

Çizelge 4.12. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,119174	9,038262	9,085445	9,038551	8,954591	8,81739
%1.0	5,119174	9,092544	8,941925	8,990128	8,726999	8,743333
%1.5	5,119174	9,06506	8,937736	8,812588	8,215145	7,75326
%2.0	5,119174	9,033531	8,875246	8,321989	8,048725	7,484086
%2.5	5,119174	8,987466	8,803763	8,015367	7,64155	6,939261
%K	5,119174	8,977153	8,973357	9,267049	8,903553	8,892451
%AK	5,119174	8,96214	8,893525	9,24689	8,847741	8,880776



Şekil 4.12. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

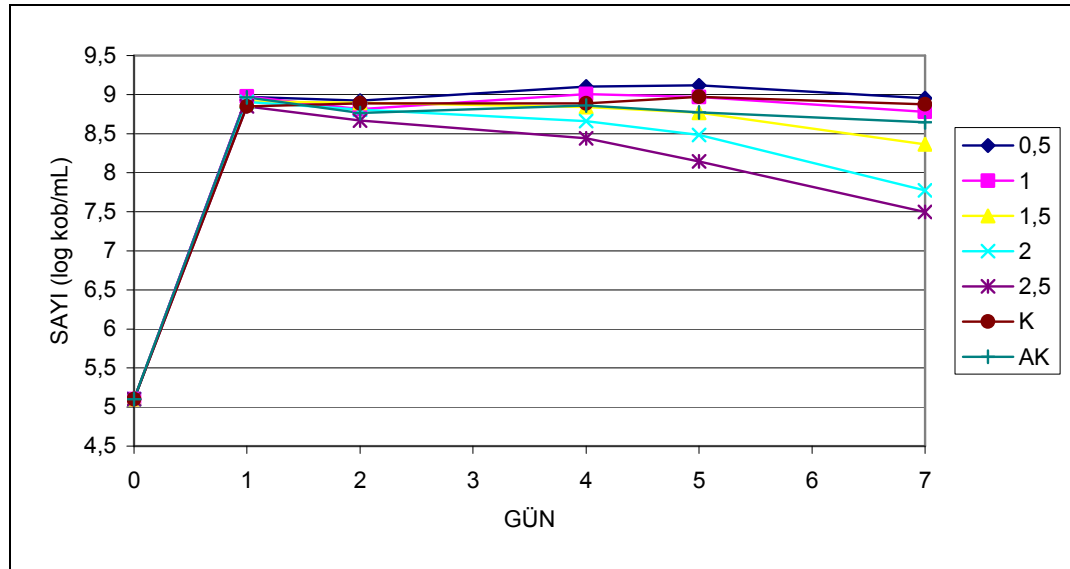
H.Y.S. ekstraktı

H.Y.S. ekstraktı ile yapılan çalışma sonuçları Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13' de verilmektedir. Bu ekstraktta da denemenin ilk iki gününde bakteri karşısında etki gözlenmezken 4. günden itibaren %2 ve 2,5 konsantrasyonlarının etki gösterdiği 5. günden itibaren kısmen %1.5 konsantrasyonunun da etki gösterdiği görülmüştür.

Deneme sürecinde K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonucu değerleri 8.97131 ile 8.64615 kob/mL arasında değişirken 7. günde ekstraktın %1.5, 2.0 ve 2.5 konsantrasyonlarının logaritmik sayım sonuçlarının sırasıyla 8.364762, 7.772654 ve 7.497818 kob/mL değerlerine kadar azaldığı görülmüştür. Ekstrakt için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları da %1.5 konsantrasyonu için 7. günde, %2 ve 2.5 konsantrasyonlarında 4., 5. ve 7. günlerde bulunan etkinin $p < 0,01$ seviyesinde anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.13. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,101625	8,97304	8,923416	9,10151	9,117034	8,953921
%1.0	5,101625	8,977697	8,813427	9,008642	8,966659	8,77799
%1.5	5,101625	8,914781	8,894155	8,841343	8,769756	8,364762
%2.0	5,101625	8,905489	8,807776	8,659293	8,48275	7,772654
%2.5	5,101625	8,847741	8,66669	8,439261	8,14574	7,497818
%K	5,101625	8,847712	8,888786	8,885697	8,97131	8,875331
%AK	5,101625	8,9643	8,764886	8,861522	8,770074	8,64615



Şekil 4.13. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Y.S. ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.

Yaklaşık 10^5 kob/mL seviyesinde seyreltilmiş kültür ile çalışılan ekstraktlar için denemenin ilk gününden itibaren bakteri karşısında H.Ç.E. ekstraktının etkili

olduğu gözlemlenmiştir. H.Ç.S. ve H.Y.S. ekstraktlarında ise yaklaşık 10^9 kob/mL çalışmalarının aksine denemelerin özellikle son iki noktasında sayım sonuçlarında önemli bir azalma olduğu görülmüştür.

Seyreltilmiş kültür ile yürütülen ekstrakt denemelerinde etki gözlenen ekstraktların konsantrasyonları arasındaki etki aralıklarında açılmalar olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizlerle elde edilen bulgular da ortalamalar arasındaki fark değerlerinde artışı işaret etmektedir.

Bu kısımda yürütülen çalışmalarda istatistiksel anlamın oluşumunda birbirinden bağımsız ekstrakt, konsantrasyon ve zaman parametrelerinin etkili olup olmadığını görmek amacıyla uygulanan Genel Çizgisel Model/Genel Rastlantı Değişkeni/Scheffe testi sonucunda her üç parametrenin de önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu görülmüştür.

İççe Faktörlü Denemelerde Varyans analizi kullanılarak ekstrakt bazında konsantrasyonun ve ekstrakt konsantrasyonları içinde zamanın etkisinin önemli ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur (EK 2).

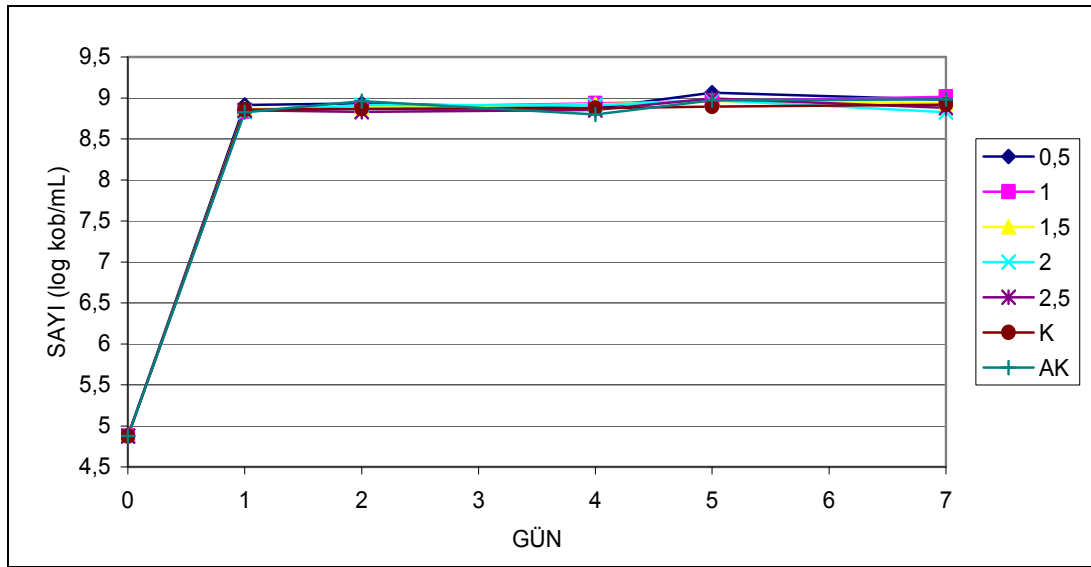
4.1.2.2. Seyreltilmiş kültür ile yapılan H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonlarının çalışmaları sonuçları

H.Ç.E.K. fraksiyonu

Seyreltilmiş kültür çalışmalarının ikinci kısmında H.Ç.E. ekstraktının alt fraksiyonları ile yürütülen antibakteriyel etki denemelerinden H.Ç.E.K. fraksiyonu sonuçları Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14' de verilmektedir. Fraksiyonun deneme boyunca *E. coli* O157:H7 karşısında etki sağlayamadığı görülmüştür. K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonuçları 5. günde sırasıyla 8.894931 ve 8.972428 kob/mL ve 7. günde 8.91781 ve 8.980895 kob/mL iken %2.5 konsantrasyonunu 5. ve 7. günlerdeki sayım sonucunun 8.993883 ve 8.880211 kob/mL olduğu tespit edilmiştir. H.Ç.E.K. fraksiyonuna ait çalışmaların tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçlarında %2.5 konsantrasyonu için bulunan $p<0,01$ düzeyindeki anlamlı etki bakteriyel gelişimi etkileme anlamında önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.14. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	4,875845	8,914122	8,931655	8,874576	9,061926	8,980742
%1.0	4,875845	8,836654	8,888802	8,93178	8,964454	9,014647
%1.5	4,875845	8,869456	8,885622	8,921027	8,960525	8,936149
%2.0	4,875845	8,830412	8,915458	8,910888	8,973466	8,826606
%2.5	4,875845	8,847142	8,829006	8,852247	8,993883	8,880211
%K	4,875845	8,855425	8,868065	8,876664	8,894931	8,91781
%AK	4,875845	8,826638	8,959495	8,797932	8,972428	8,980895



Şekil 4.14. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

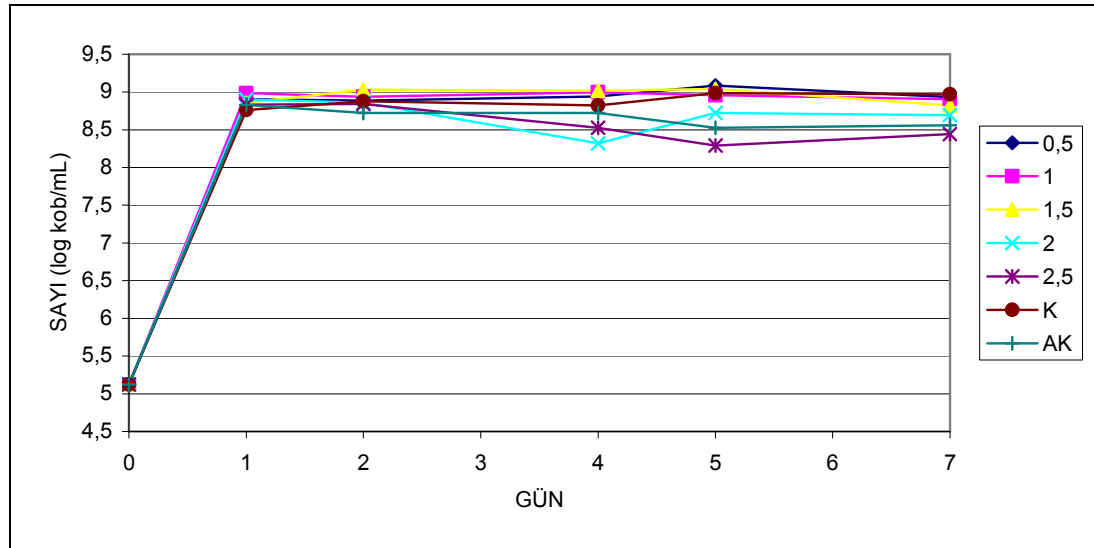
H.Ç.E.E.A. fraksiyonu

H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçlarına Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15' de yer verilmektedir. Çalışmanın 4. gününde %2.0 ve 2.5 konsantrasyonlarında, 5. ve 7. günlerinde %2.5 bakteri karşısında kısmen bir etki olduğundan söz edilebilse de ana ekstraktlarda gözlenen düzeyde bir azalma sağlanamamıştır. K ve AK grupları için logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.986772 ve 8.525908 kob/mL ve 7. günde 8.970568 ve 8.558105 kob/mL iken %2.5 konsantrasyonunda 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.290035 ve 8.442831 kob/mL sayısal değerleri elde edilmiştir. Fraksiyon için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları 5. günde %2.0 ve 2.5

konsantrasyonlarının ve 7. günde %2.5 konsantrasyonunun $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.15. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,121773	8,906694	8,883636	8,942834	9,08636	8,933832
%1.0	5,121773	8,986772	8,938954	8,99855	8,957448	8,905985
%1.5	5,121773	8,857332	9,029939	9,015639	9,042707	8,821501
%2.0	5,121773	8,901277	8,856913	8,319222	8,721811	8,693811
%2.5	5,121773	8,832509	8,840218	8,5272	8,290035	8,442831
%K	5,121773	8,760925	8,876255	8,822005	8,986772	8,970568
%AK	5,121773	8,82823	8,723579	8,720159	8,525908	8,558105



Şekil 4.15. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

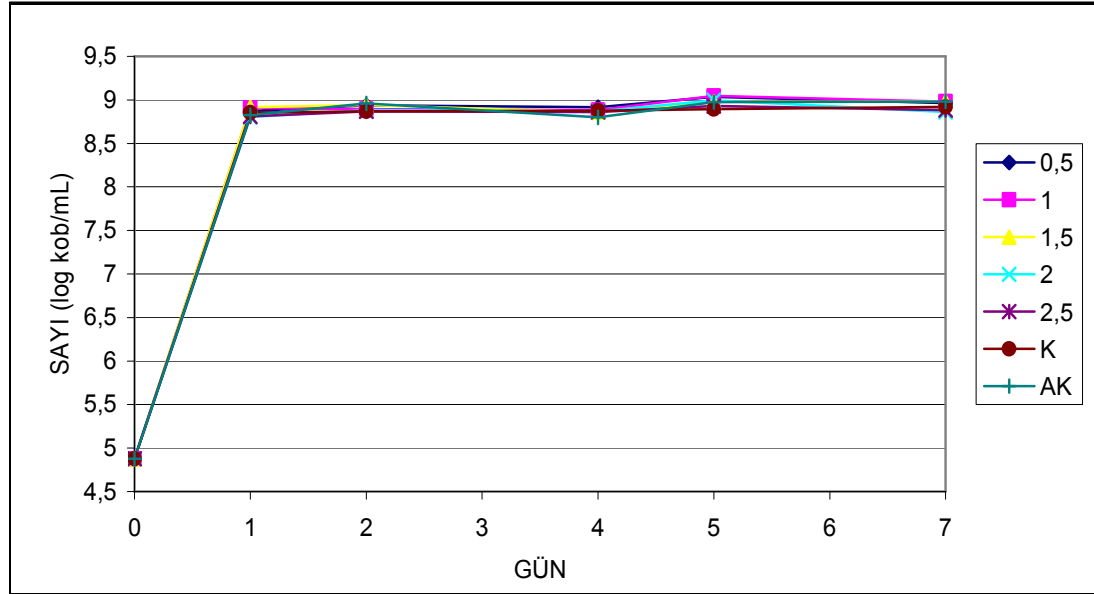
H.Ç.E.H. fraksiyonu

Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16' da H.Ç.E.H. fraksiyonuna ait deneme sonuçlarına yer verilmektedir. Deneme süreci boyunca fraksiyonun bakteri karşısında etkili olmadığı görülmüştür. K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonucu değerleri denemenin 5. gününde 8.894931 ve 8.972428 kob/mL ve 7. günde 8.91781 ve 8.980895 kob/mL iken en yüksek konsantrasyon olan %2.5 için 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.929075 ve 8.882379 kob/mL logaritmik sayım değerleri elde edilmiştir. Fraksiyon için yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçları %2.5 konsantrasyonu 7.

gün noktasında $p < 0,01$ seviyesinde anlamlı bir etki olduğunu göstermektedir ancak bu etki bakteriyel gelişimi etkileyecek düzeyde anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.16. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	4,875845	8,873965	8,939318	8,916063	9,036345	8,962587
%1.0	4,875845	8,910338	8,892317	8,882511	9,04629	8,979401
%1.5	4,875845	8,915601	8,939863	8,856269	8,979242	8,979712
%2.0	4,875845	8,80168	8,883153	8,869232	8,995682	8,863114
%2.5	4,875845	8,810629	8,870181	8,861682	8,929075	8,882379
%K	4,875845	8,855425	8,868065	8,876664	8,894931	8,91781
%AK	4,875845	8,826638	8,959495	8,797932	8,972428	8,980895



Şekil 4.16. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.H. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

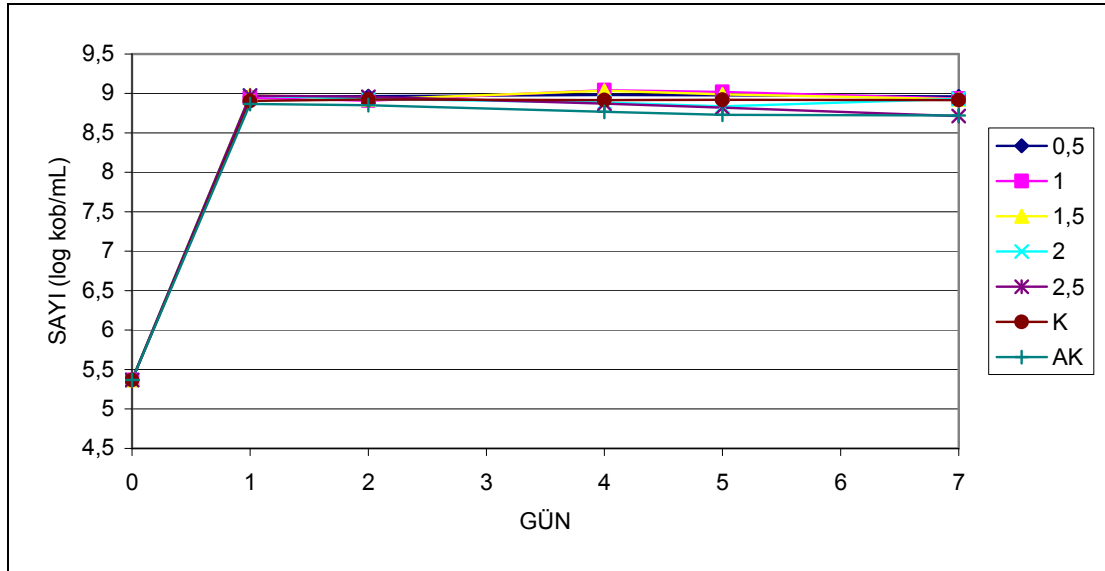
H.Ç.E.B. fraksiyonu

H.Ç.E.B. fraksiyonuna dair çalışma sonuçlarının verildiği Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17' de fraksiyonunun *E. coli* O157:H7 karşısında etki göstermediği görülmektedir. K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.918271 ve 8.72738 kob/mL ve 7. günde 8.914137 ve 8.720559 kob/mL iken %2.5 konsantrasyonunu 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.821265 ve 8.714831 kob/mL logaritmik sayısında olduğu tespit edilmiştir. Fraksiyon için yürütülen çalışmalara

ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçlarında veriler istatistiksel anlamda ($p=0,05$) etkili bulunmamıştır.

Çizelge 4.17. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,368153	8,957917	8,966282	8,979107	8,978346	8,960409
%1.0	5,368153	8,944946	8,908606	9,040674	9,019971	8,935163
%1.5	5,368153	8,982758	8,922497	9,035357	8,987568	8,926535
%2.0	5,368153	8,973929	8,932693	8,886893	8,836603	8,932256
%2.5	5,368153	8,972559	8,956149	8,871912	8,821265	8,714831
%K	5,368153	8,902841	8,923375	8,916698	8,918271	8,914137
%AK	5,368153	8,865768	8,85077	8,766766	8,72738	8,720559



Şekil 4.17. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.B. fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

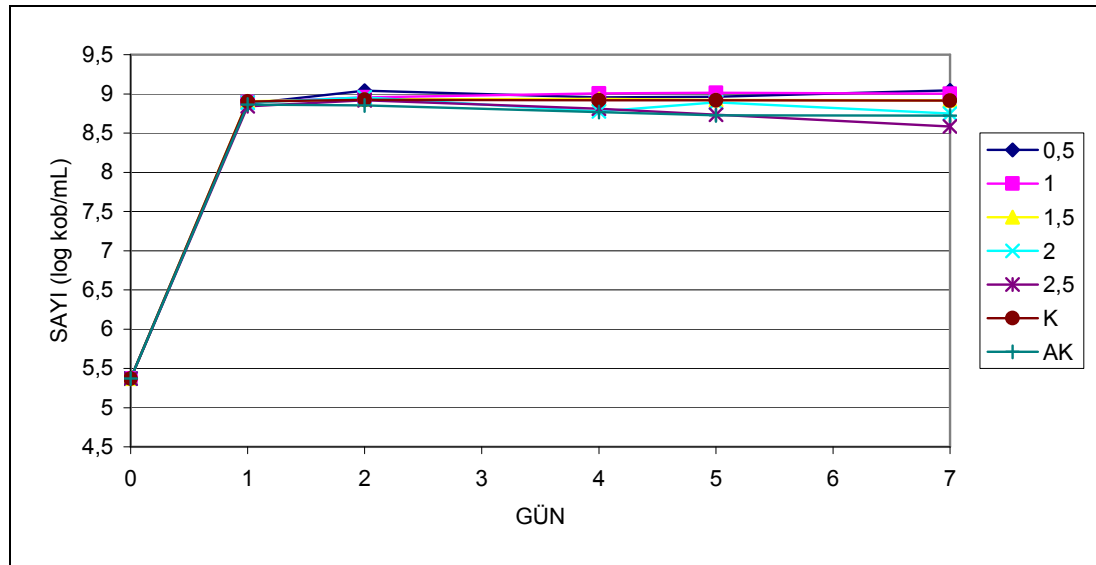
H.Ç.E.K.S. fraksiyonunu

H.Ç.E.K.S. fraksiyonunun antibakteriyel etki araştırma bulguları ise Çizelge 4.18 ve Şekil 4.18' de yer almaktadır. Fraksiyonun *E. coli* O157:H7 karşısında deneme sürecinde etkili olmadığı görülmüştür. K ve AK gruplarının logaritmik sayım sonuçları 5. günde 8.918271 ve 8.72738 kob/mL ve 7. günde 8.914137 ve 8.720559 kob/mL iken %2.5 konsantrasyonunu 5. ve 7. günlerde sırasıyla 8.73289 ve 8.584396 kob/mL logaritmik sayısında olduğu tespit edilmiştir. Fraksiyon için

yürütülen çalışmalara ait tek yönlü istatistiksel varyans analizlerinden Scheffe testi ile değerlendirme sonuçlarında veriler istatistiksel anlamda ($p=0,05$) etkili bulunmamıştır.

Çizelge 4.18. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S. ekstraktı antibakteriyel etki araştırması logaritmik sayım sonuçları.

	0.GÜN	1.GÜN	2.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
%0.5	5,368153	8,875511	9,041831	8,957753	8,965174	9,044074
%1.0	5,368153	8,896165	8,956111	9,006536	9,013042	9,00185
%1.5	5,368153	8,905023	8,929569	8,938686	8,920077	8,919047
%2.0	5,368153	8,888133	8,954332	8,777366	8,889425	8,749431
%2.5	5,368153	8,841213	8,917563	8,80914	8,73289	8,584396
%K	5,368153	8,902841	8,923375	8,916698	8,918271	8,914137
%AK	5,368153	8,865768	8,85077	8,766766	8,72738	8,720559



Şekil 4.18. Seyreltilmiş kültür ile çalışılan H.Ç.E.K.S fraksiyonu antibakteriyel etki sonuçları.

Yaklaşık 10^5 kob/mL seviyesindeki seyreltilmiş kültür ile yürütülen H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonları denemelerinde gerek ortalamaları alınan deney verilerinin grafiksel gösterimi gerekse verilerin tek tek analizi *E. coli* O157:H7 karşısında nispeten en etkili fraksiyonun H.Ç.E.K. olduğunu göstermektedir. Ancak H.Ç.E. ekstraktının gösterdiği etkinin alt fraksiyonlarındakinden daha yüksek olması bakteri karşısında etki eden maddenin tek bir alt fraksiyonda toplanmamış olduğunu düşündürmektedir.

Bu kısımda yürütülen çalışmalarda istatiksl anlamın oluşumunda birbirinden bağımsız ekstrakt, konsantrasyon ve zaman parametrelerinin etkili olup olmadığını görmek amacıyla uygulanan Genel izgisel Model/Genel Rastlantı Değişkeni/Scheffe testi sonucunda her  parametrenin de önemli ($p < 0,01$) etkiye sahip olduğu görülmüştür.

İçiçe Faktörlü Denemelerde Varyans analizi kullanılarak ekstraktlar bazında konsantrasyonun ve ekstrakt konsantrasyonları içinde zamanın etkisinin önemli ($p < 0,01$) olduğu bulunmuştur (EK 2).

4.2. AKM İle Görüntü Eldesine İlişkin Bulgular

AKM ile görüntü eldesi için hazırlanan preparatlar, ekstraktlar ve fraksiyonlar için seyreltilmiş kültür ile yapılan antibakteriyel etki araştırmasında kullanılan %2,5 konsantrasyonlu tüplerden, bir haftalık etkileşim süreci sonunda alınan örneklerle hazırlanmıştır. Etken maddeden gelen etkinin karşılaştırılabilmesi amacıyla; seyreltilmiş kültür ile yapılan antibakteriyel etki araştırmasında kullanılan Kontrol grubundan, yine bir haftalık inkübasyon süresi sonunda, örnek alınarak preparat hazırlanmıştır.

Antibakteriyel etki tespit çalışmasında kullanılan kontrol grubundan hazırlanan preparata ait $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ lik alanda çekilmiş AKM topografik görüntüsünde bakteri yüzeyinde bir hasarlanma gözlenmemektedir (Şekil 4.19). Bu AKM görüntüsüne ait boyut analizi değerlendirmesinde bakterinin $0,768 \times 3,309 \mu\text{m}$ boyutlarında olduğu görülmektedir(Şekil 4.20).

Bergey (1986), *E. coli* O157:H7 suşuna dahil olan bakterilerin, $1-1,5 \times 2-6 \mu\text{m}$ boyutlarında düzgün çubuk şeklinde olduğunu belirtmektedir (García et al., 2005-basımında). Bulunan AKM görüntülerinin boyut analizleri literatürde bulunan değer aralığı içinde yer almaktadır.

H.Ç.E. ekstraktı ile etkileştirilmiş *E.coli* O157:H7' ye ait $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ lik alanda çekilmiş AKM topografik görüntüsü Şekil 4.21'de verilmektedir. Bakteri hücre çeperinde hasarlanma olduğu şekilde görülmektedir. Görüntüye ait boyut analizi sonucunda bakterinin $0,553 \times 3,466 \mu\text{m}$ boyutlarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Braga and Ricci (1998) bakteri hücre duvarındaki hasarlanmanın AKM boyut analizi ile gösterilebileceğini ifade edip hasar görmüş bir bakteri hücrelerine ait boyut analizi grafiğine yer vermişlerdir. Yürütülen çalışmada da H.Ç.E. ekstraktı ile etkileştirilmiş bakteri hücre duvarında literatürde yer alan hasarlanma aynı bazda gözlenmiştir.

H.Y.E. ekstraktı ile etkileştirilen *E.coli* O157:H7' ye ait $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ lik alanda çekilmiş AKM topografik görüntüsü Şekil 4.23' de yer almaktadır. Topografik görüntüde gözlenen pürüzler yakalanan görüntü kalitesiyle ilintili bulunmuştur. H.Y.E. ekstraktı için çekilen AKM görüntüsünün boyut analizinden bakteri

yüzeyinde bir hasarlanma olmadığı çıkarımı yapılmıştır; görüntülenen bakterinin 0,793 x 3,016 µm boyutlarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24).

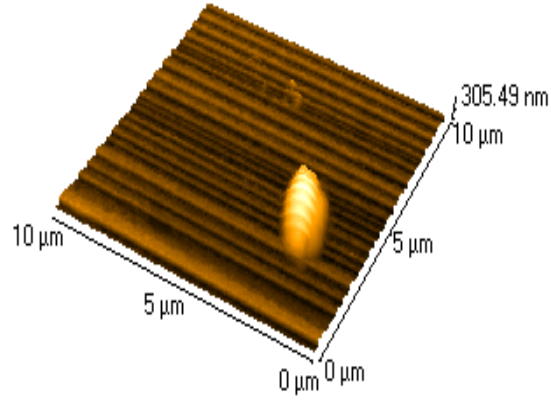
H.Ç.S. ekstraktı ile etkileştirilen *E.coli* O157:H7' ye ilişkin 50x50 µm² lik alanda çekilen AKM topografik görüntüsünün verildiği Şekil 4.25' de bakteri yüzeyinde hasarlanma olmadığı görülmektedir. Bu görüntünün boyut analizi sonucunda bakteri boyutları 0,414 x 3,699 µm boyutlarında olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.26).

H.Y.S. ekstraktı ile etkileştirilen *E. coli* O157:H7' ye ait 30 x 30 µm²lik alanda çekilmiş AKM görüntüsü Şekil 4.27' de yer almaktadır. Bu şekilde de bakteri yüzeyinde hasarlanma olmadığı gözlemlenmektedir. İlgili görüntünün boyut analizinin yer aldığı Şekil 4.28'den bakteri boyutlarının 0,735 x 3,678 µm olduğu anlaşılmaktadır.

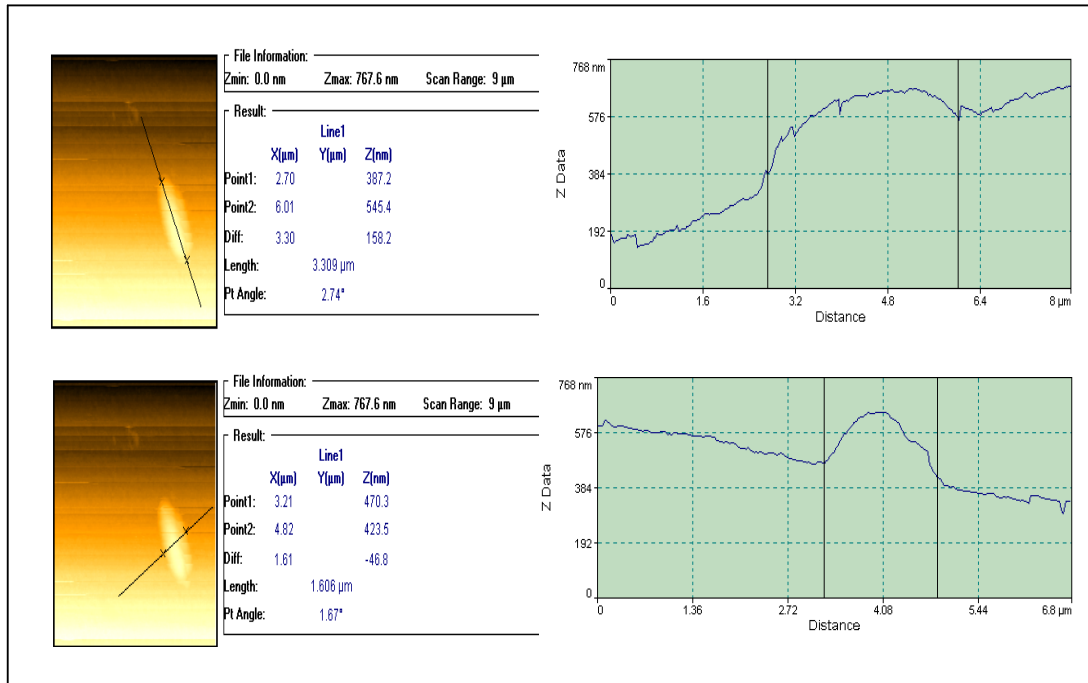
H.Ç.E. ekstraktının alt fraksiyonları içinde *E. coli* O157:H7 karşısında, ekstraktta gözlenen inhibitör etkinin elde edilememesi literatürde diğer bakteriler ile yapılan çalışmalardan öngörülen H.Ç.E.E.A. ve H.Ç.E.K. için de AKM görüntüleme işlemine gidilmiştir (Erdoğan et al., 2001).

Bu fraksiyonlardan H.Ç.E.E.A. fraksiyonu ile etkileştirilen *E. coli* O157:H7' ye ait 10x10 µm²lik alanda çekilen AKM görüntüsü Şekil 4.29' da verilmektedir. İlgili görüntünün Şekil 4.30' da yer alan boyut analizi sonucunda 0,534 x 4,985 µm boyutlarındaki bakterinin yüzeyinde önemli bir zedelenme olmadığı sonucuna varılmıştır.

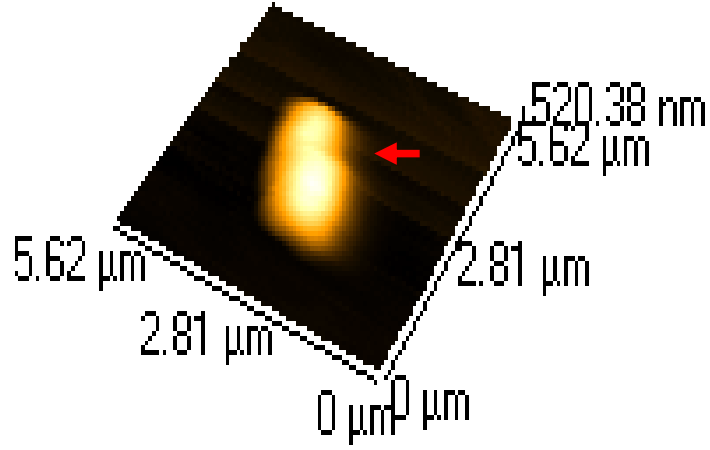
Şekil 4.31'de H.Ç.E.K. fraksiyonu ile etkileştirilen *E. coli* O157:H7' ye ait 30x30 µm²lik alanda çekilen AKM görüntüsü yer almaktadır. Bu AKM görüntüsünün boyut analizi de Şekil 4.32' de yer almaktadır. Boyut analizinde 0,530 x 5,831 µm boyutlarında olduğu bakteri yüzeyinde bir hasarlanma olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.19. Bir hafta boyunca inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin 10x10 µm² alanda çekilmiş topografik görüntüsü.

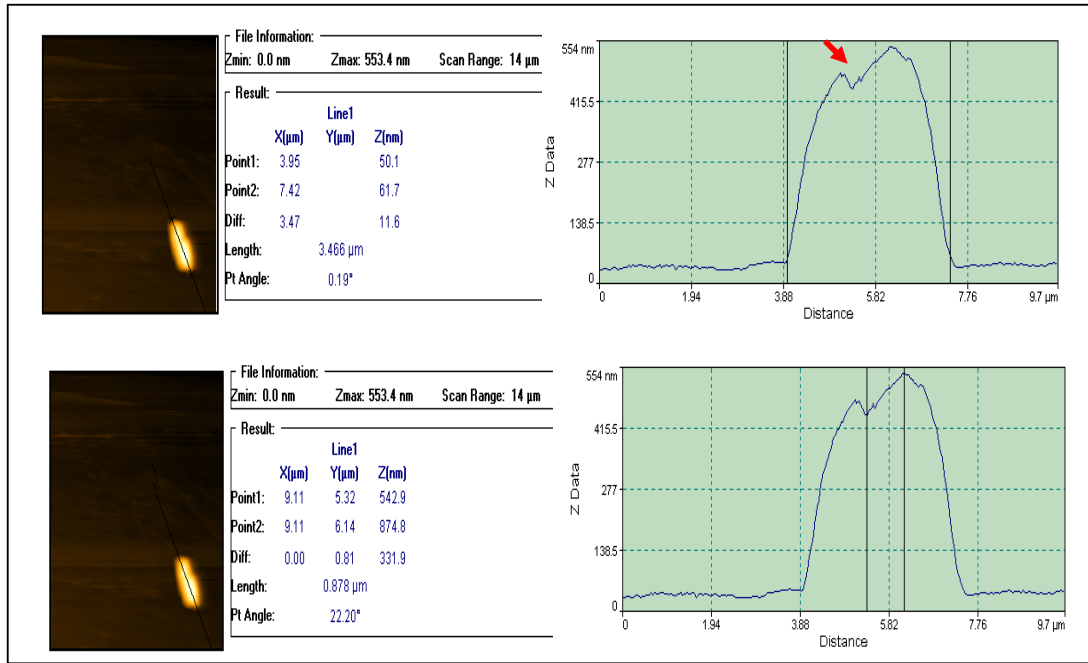


Şekil 4.20. Bir hafta boyunca inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.

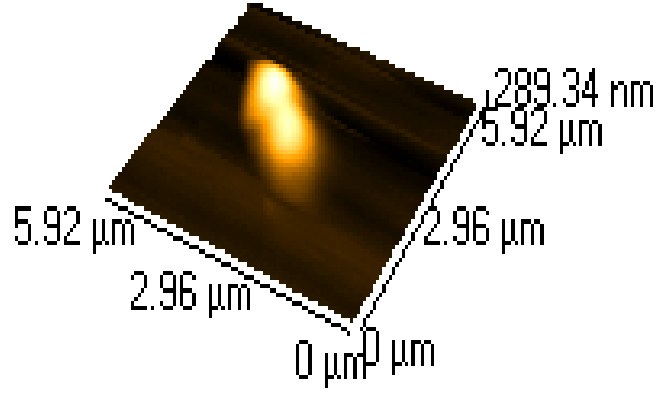


Şekil.4.21. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin 15x15 μm^2 alanda çekilmiş* topografik görüntüsü.

* Görüntü matematiksel zumlama ile 5,62 x 5,62 μm^2 lik alanda verilmiştir.

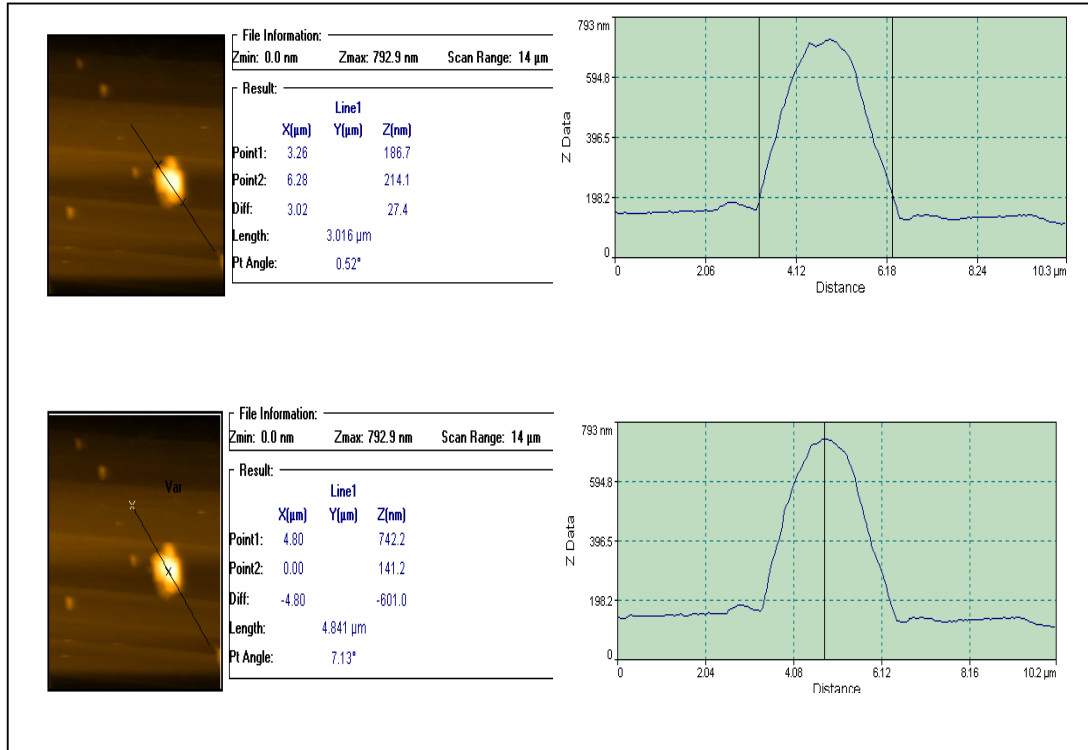


Şekil 4.22. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.

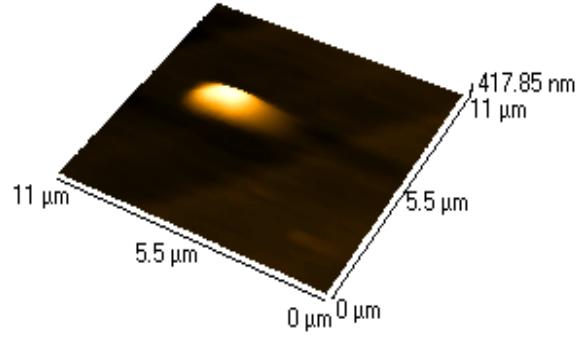


Şekil 4.23. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ alanda çekilmiş topografik görüntüsü.

* Görüntü matematiksel zumlama ile $5,92 \times 5,92 \mu\text{m}^2$ lik alanda verilmiştir.

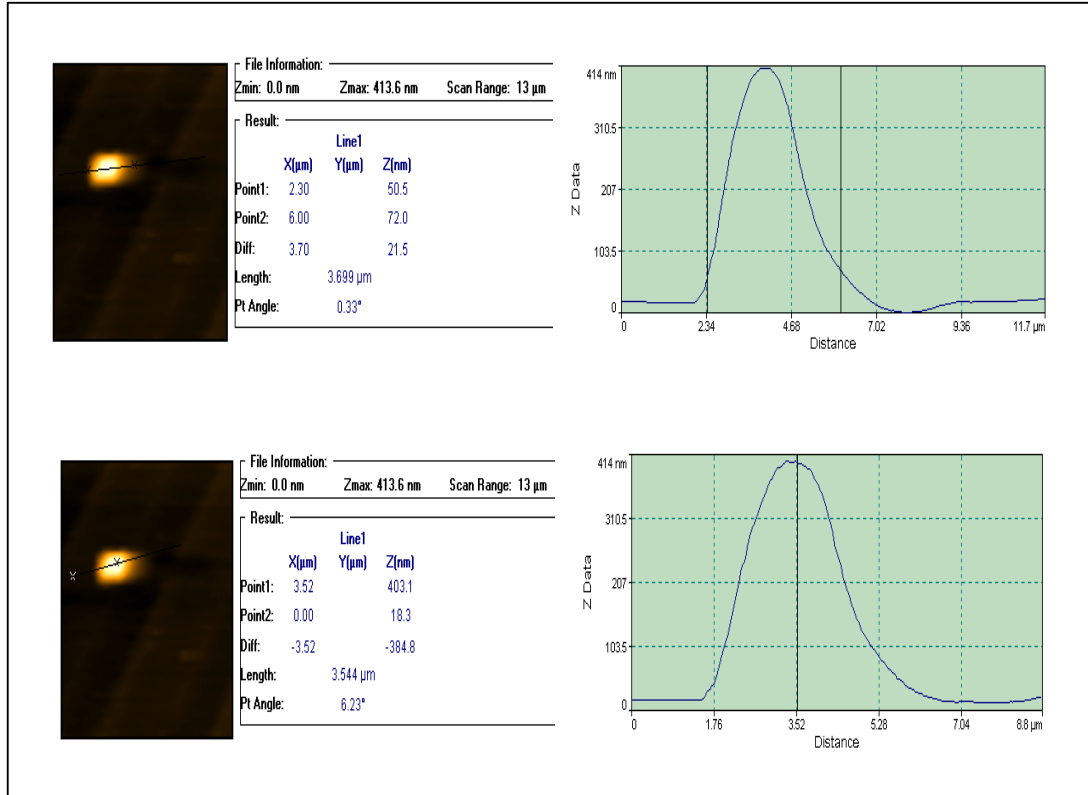


Şekil 4.24. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.E. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.

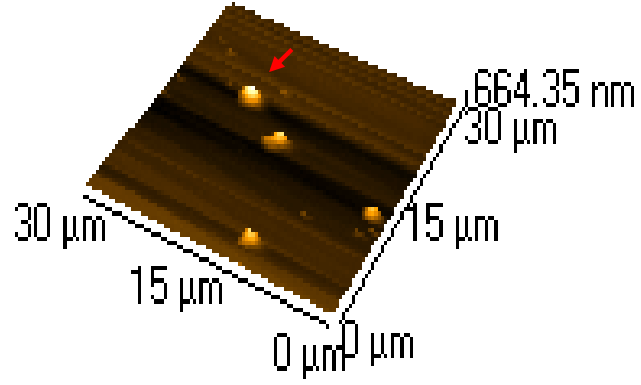


Şekil 4.25. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ alanda çekilmiş topografik görüntüsü.

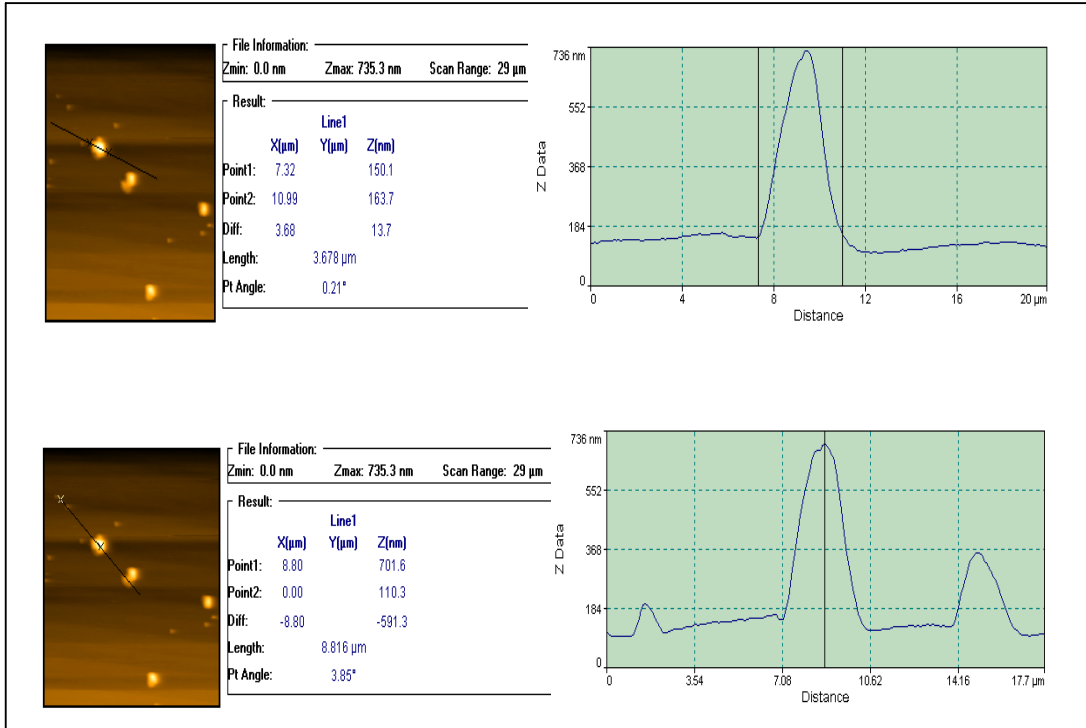
* Görüntü matematiksel yakınlaşma(zumlama) ile $11 \times 11 \mu\text{m}^2$ lik alanda verilmiştir.



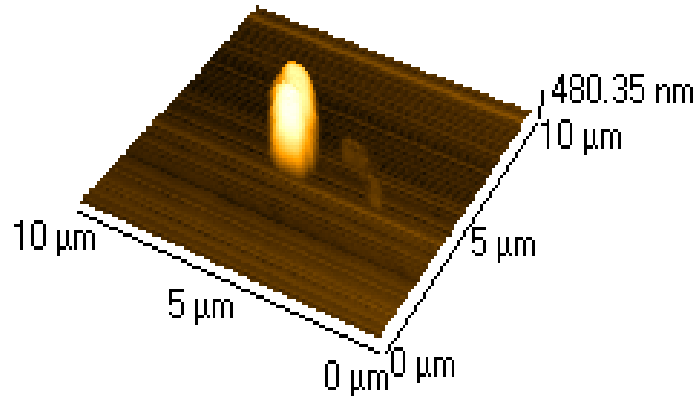
Şekil 4.26. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.



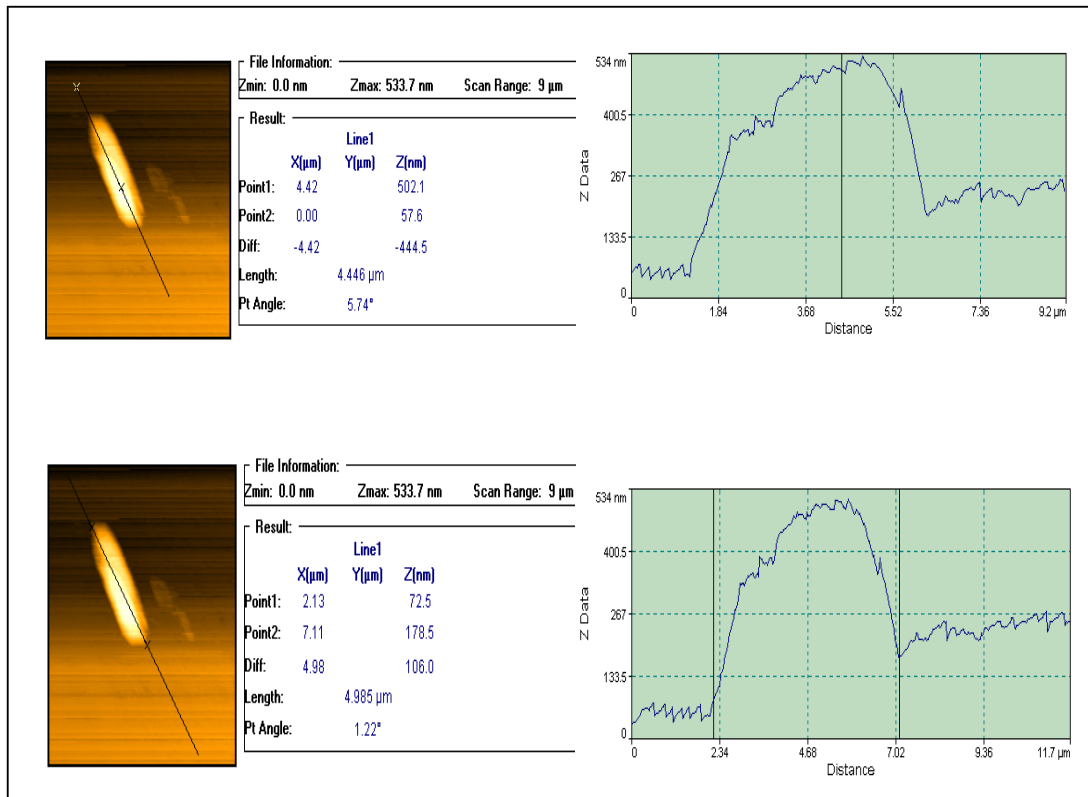
Şekil 4.27. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin 30x30 μm^2 alanda çekilmiş topografik görüntüsü.



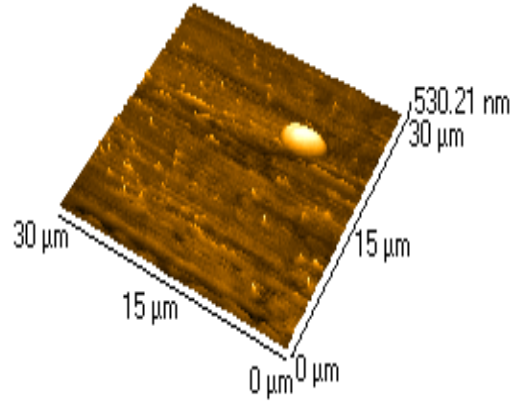
Şekil 4.28. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Y.S. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.



Şekil 4.29. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.E.A. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin 10x10 μm^2 alanda çekilmiş topografik görüntüsü.

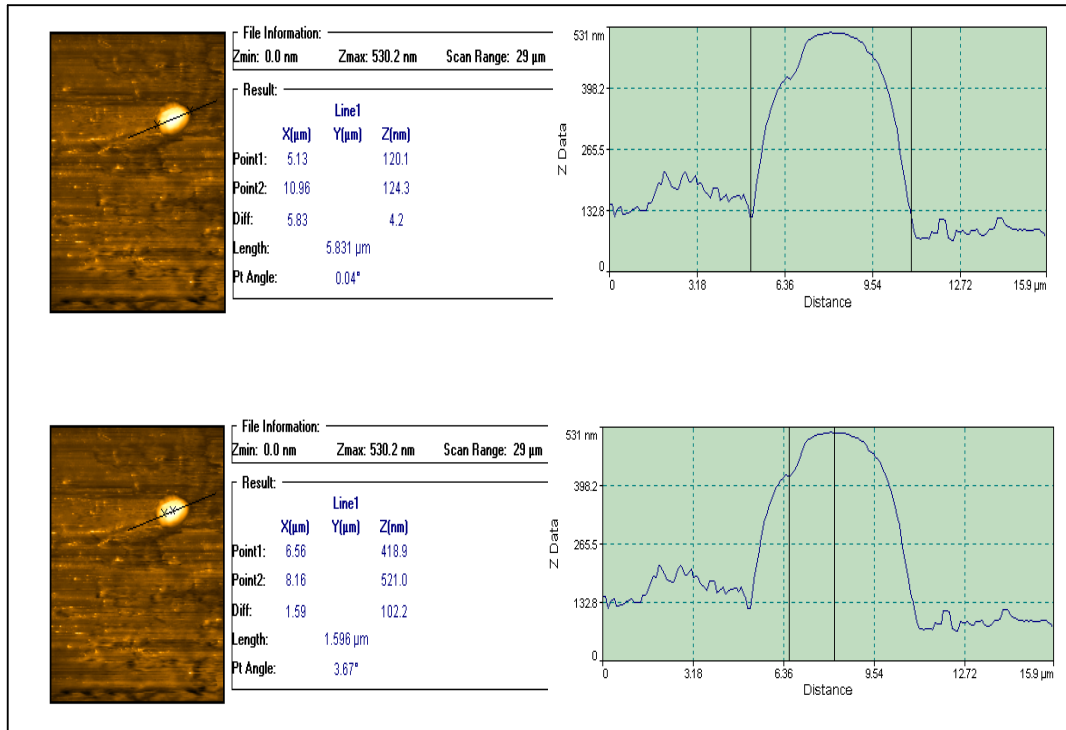


Şekil 4.30. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.E.A. fraksiyonu ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.



Şekil 4.31. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.K. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin topografik 30 x 30 μm^2 alanda çekilmiş görüntüsü.

* Görüntü matematiksel yakınlaşma(zumlama) ile 10x 10 μm^2 lik alanda verilmiştir.



Şekil 4.32. Bir hafta boyunca % 2.5 H.Ç.E.K. ekstraktı ile inkübe edilmiş *E.coli* O157:H7' nin boyut analizi.

5. TARTIŞMA VE YORUM

Doğal olarak gıdaların yapısında yer alan antimikrobiyal bileşenlerin varlığının tespit edilmesi ürün formülasyonlarında revizyonlara gidilmesine olanak tanımaktadır. Bu çalışmada halk arasında şifalı bir bitki olarak bilinen ve kaynatılarak çay halinde tüketilen, *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisinin günümüzde gıda kaynaklı hastalıklara önemli bir sebep olarak mücadele edilen *E. coli* O157:H7 karşısında antibakteriyel etkisi araştırılmıştır.

Bitkinin farklı ekstraktları ile yürütülen antibakteriyel etki araştırma denemeleri sonucunda elde edilen bulgular H.Ç.E. ekstraktının bakteri karşısında en fazla etkiyi sağladığı ve AKM ile bakteri hücre duvarında zedelenme olduğu tespit edilmiştir. Etkisi belirlenen ekstraktın alt fraksiyonları ile denemeler devam ettirilerek etken maddenin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Ancak alt fraksiyonlarla yürütülen çalışmalar sonucunda H.Ç.E. ekstraktı ile elde edilen düzeyde etki gözlenmemiştir. H.Ç.E.K. ve H.Ç.E.E.A. fraksiyonları ile yürütülen AKM görüntüleme işlemi sonucunda da, hücre duvarında ana ekstraktta gözlenen düzeyde bir hasarlanma gözlenmemiştir. Bu nedenle bakteri karşısında sağlanan etkinin birden fazla maddeden kaynaklandığı yorumu yapılmıştır.

Antibakteriyel etkinin başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu ile bağlantılı olduğuna dair bilgiler doğrultusunda, yaklaşık 10^5 kob/mL seviyesindeki seyreltilmiş kültür kullanılarak yürütülen çalışmalar sonucunda ekstraktlarda bakteri karşısında görülen inhibisyon etkisinin yaklaşık 10^9 kob/mL seviyesinde kültür ile yürütülen çalışma sonuçlarına göre daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürde *Helichrysum* türlerinin antibakteriyel etkileri ile ilgili çalışmalar, inhibisyon etkisinin genel olarak Gram-pozitif mikroorganizmalar üzerine olduğunu ve çalışılan Gram-negatif bakterilerde genel olarak antibakteriyel etkinin tespit edilemediğini göstermektedir. Yürütülen çalışmada kullanılan *E.coli* O157:H7 üzerinde bir inhibisyon etkisi gözlenmiş olmasına rağmen bu bitki alt türü ile Gram-pozitif mikroorganizmalar üzerinde çalışılması halinde daha yüksek etki elde edilebileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abedon, S.T., 2005, Bacteria Binomials, <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol4045.htm>.
- Afolayan, A.J. and Meyer, J.J.M., 1997, The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aurenitens*, Journal of Ethnopharmacology, 57, 177-181.
- Angulo, F., Voetsch, A., Vugia, D., Hadler, J., Farley, M., Hedberg, C., Cieslak, P., Morse, D., Dwyer, D., Swerdlow, D., FoodNet Working group, 2005, Determining the burden of human illness from foodborne diseases: CDC's Emerging infectious disease program foodborne disease active surveillance network (Foodnet), http://www.cdc.gov/foodnet/publications/1998/angulo_1998p.pdf.
- Anonymous, 2005a, <http://www.stewo.no/H/Helichrysum%20plicatum%204,9.JPG>
- Anonymous, 2005b, <http://biyoloji.egitim.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/ast/hel/pli/pli/>
- Anonymous, 2005c, Symptoms of *Escherichia coli* O157:H7; Wrong Diagnosis, http://www.wrongdiagnosis.com/e/escherichia_coli_o157_h7/symptoms.htm.
- Anonymous, 2000, Merck Microbiology Manual, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 407p.
- Aslan, M., 2000, Şeker Hastalığına Karşı Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, 216s.
- Aslan, M., 1994, *Helichrysum plicatum* D.C. ssp. *plicatum* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, 65s.
- Barbour, E.K., Sharif, M.A., Sagherian, V.K., Habre, A.N., Talhouk, R.S. and Talhouk, S.N., 2004, Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity, Journal of Ethnopharmacology, 93 1-7.
- Bell, C. and Kyriakides, A., 2002, Patogenic *Escherichia coli*. Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and controls, Blackburn, C.W. and McClure, P.J. (eds), CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, pp. 279-307.
- Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., and Bernardini, A.F., 2001, Composition of *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France), Flavour and Fragrance Journal, 16, 30-34.
- Bougatsos, C., Meyer, J.J.M., Magiatis, P., Vagias, C. and Chinou, I.B., 2003, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Helichrysum kraussii* Sch. Bip. and *H. rugulosum* Less. from South Africa, Flavour and Fragrance Journal, 18, 48-51.

- Braga, P.C. and Ricci, D., 2000a, Detection of rokitamycin-induced morphostructural alterations in *Helicobacter pylori* by Atomic Force Microscopy, *Chemotherapy*, 46, 15-22.
- Braga, P.C. and Ricci, D. 2000b, Atomic force microscopy. *Methods in Molecular Medicine*. Gillespie, S.H. (ed.), Humana Pres Inc., Totowa, NJ, 48, pp.199-207.
- Braga, P.C. and Ricci, D., 1998, Atomic Force Microscopy: Application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime, *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 42, 1, 18-22.
- Cavalli, J.F., Ranarivelo, L., Ratsimbason, M., Bernardini, A.F. and Casanova, J., 2001, Constituents of the essential oil of six *Helichrysum* species from Madagascar, *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 253-256.
- CDC, 2005, Disease Information, *Escherichia coli* O157:H7, http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm#What%20%20is%20%20Escherichia%20coli%20O157:H7.
- Cnandrasekaran, M. and Venkatesalu, V., 2004, Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds, *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 105-108.
- Cook, N.C. and Samman, S., 1996, Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective Effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Czinner, E., Hagymási, K., Blázovics, A., Kéry, A., Szöke, É. and Lemberkovic, É., 2000, In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Journal of Ethnopharmacology*, 73,437-443.
- Dilika, F., Bremner, P.D. and Meyer, J.J.M., 2000, Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites, *Fitoterapia*, 71, 450-452.
- Dufour, M., Simmonds, R.S. and Bremer, P.J., 2003, Development of a method to quantify in vitro synergistic activity of “natural” antimicrobials, *International Journal of Food Microbiology*, 85, 249-258.
- Ellingson, J.L.E., Kozicskowski, J.J., Anderson, J.L., Carlson, S.A. and Sharma, V.K., 2005, Rapid PCR detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in bovine food products and feces, *Molecular and Cellular Probes*, 19, 213-217.
- Erdoğrul, O.T., Cakiroglu, E. and Karaman, S., Antibacterial activities of *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum* extracts, 2001, *The Sciences*, 1, (3), 176-178.
- García, D., Gómez, N., Raso, J. and Pagán, R., 2005, Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, xx, xxx-xxx (basımda).

- Jablasone, J., Warriner, K. and Griffiths, M., 2005, Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system, *International Journal of Food Microbiology*, 99, 7-18.
- Juneja, L.R., Okubo, T. and Hung, P., 2000, Catechins. *Natural Food Antimicrobial Systems*, Naidu, A.S. (ed), CRC Press, United States of America, pp. 381-398.
- Karaman, S. and Kocabas, Y.Z., 2001, Traditional Medicinal Plants of K. Maras (Turkey), *The Sciences*, 1, 3, 125-128.
- Kim, H.O., Park, S.W. and Park, 2004, Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot, *Food Microbiology*, 21, 105-110.
- Kirby, A.R., Gunning, A.P. and Morris, V.J., 1995, Atomic Force Microscopy in food research: A new technique comes of age. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 359-365.
- Koohmaraie, M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Guerini, M., Shachelford, S.D. and Wheeler, T.L., 2005, Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef, *Meat Science*, xx, xxx-xxx (basımda).
- Kovacs, B.J., Aprecio, R.M., Kettering, J.D. and Chen, Y.K., 1998, Efficacy of various disinfectants in killing a resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* by comparing zones of inhibition: implications for endoscopic equipment reprocessing, *The American Journal of Gastroenterology*, 93,11, 2057-2059.
- Lall N. and Meyer, J.J.M., 1999, In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 347-354.
- Li, Q. and Logue, C.M., 2005, The growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on minced bison and pieces of bison meat stored at 5 and 10 °C, *Food Microbiology*, 22, 415-421.
- Lourens, A.C.U., Reddy, D., Başer, K.H.C., Vijjoen, A.M. and van Vuuren, S.F., 2004, In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 253-258.
- Mathekga, A.D.M., Meyer, J.J.M., Horn, M.M. and Drewes, S.E., 2000, An acylated phloroglucinol with Antimicrobial properties from *Helichrysum caespitium*, *Phytochemistry*, 53, 93-96.
- Mercanoğlu, B., 2002, İmmunomanyetik Ayırma Yöntemi (IMA) İle Gıdalardan *Salmonella* ssp. İzolasyonu, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 75s.

- Meyer, J.J.M., Afolayan, A.J., Taylor, M.B. and Erasmus, D., 1997, Antiviral activity of galangin isolated from aerial parts of *Helichrysum aurenitens*, *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 165-169.
- Meyer, J.J.M. and Afolayan, A.J., 1995, Antibacterial activity of *Helichrysum aurenitens* (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 47, 109-111.
- Mora, A., Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Dhabí, G., Echeita, A., González, A., Bernárdez and M.I., Blanco, J., Antimicrobial resistance of Shiga toxin (veratoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain, *Research in Microbiology*, xx, xxx-xxx (basımda).
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., del Vale, C.E. and Roura, S.I., 2005, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT*, 38, 565-570.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Crecelius, A.T., 2000, Flavonoids. Natural Food Antimicrobial Systems. Naidu, A.S. (ed.), CRC Press, Washington, D.C., pp. 325-348.
- Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Germanò, M.P. and Alonzo, V., 2001, Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 517-520.
- Nostro, A., Germanò M.P., D'Angelo, V., Marino, A. and Cannatelli, M.A., 2000, Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, *Letters in Applied Microbiology*, 30, 379-384.
- Özdamar, K., 1999, Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi-1, Kaan Kitabevi, ISBN 975-6787-00-7/975-6787-01-5, Eskişehir, 535s.
- Peng, L., Yi, L., Zhexue, L., Juncheng, Z., Jizxin, D., Daiwen, P., Ping, S. and Songsheng, Q., 2004, Study on biological effect of La³⁺ on *Escherichia coli* by atomic force microscopy, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 68-72.
- Rijal, K., Leung, A., Shankar, P.M. and Mutharasan, R., 2005, Detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 at 70 cells/mL using antibody-immobilized biconical tapered fiber sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, xx, xxx-xxx (basımda).
- Robichon, D., Girard, J.C., Cenatiempo, Y. and Cavellier, J.F., 1999, Atomic force microscopy imaging of dried or living bacteria, *Life Sciences*, 322,687-693.
- Ruberto, G., Biondi, D.M., Barbagallo, C., Meli, R. and Savoca, F., 2002, Constituents of stem and flower oils of *Helichrysum litoreum* Guss., *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 46-48.
- Sağdıç, O. and Özcan, M., 2003, Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols, *Food Control*, 14, 141-143.

- Sağdıç, O., Kuşçu, A., Özcan, M. and Özçelik, S., 2002, Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Food Microbiology*, 19, 473-480.
- Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G.R., Máñez, S., Giner, R.M., Cerdá-Nicolás, M. and Ríos, J.L., 2003, Assesment of the anti-inflammatory activity of tiliroside, *European Journal of Pharmacology*, 461, 53-61.
- Santos, N.C. and Castanho, M.A.R.B., 2004, An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy, *Biophysical Chemistry*, 107, 133-149.
- Stafford, G.I., Jäger, A.K. and van Staden, J., 2005, Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular South African medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 107-115.
- Steenkamp, V., Mathivha, E., Gouws, M.C. and van Rensburg, C.E.J., 2004, Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 353-357.
- Tamplin, M.L., Paoli, G., Marmer, B.S. and Phillips, J., 2005, Models of the behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46°C, *International Journal of Food Microbiology*, 100, 335-344.
- Temiz, A., 2002, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 3. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 291p.
- Tepe, B., Somken, M., Akpulat, H.A. and Somken, A., 2005, In vitro antioxidant Activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey, *Food Chemistry*, 90, 685-689.
- Tomás-Barberán, F., Iniesta-Sanmartín, E., Tomás-Lorente, F., and Rumbero, A., 1990, Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species, *Phytochemistry*, 29, 4, 1093-1095.
- William, N., 1998, Emerging foodborne pathogens: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Clinical Laboratory Science*, 11, 5, 298-305.
- Wollenweber, E., Stevens, J. F. and Ivancic, M., 1998, Flavonoid Aglycones and a thiophene derivative from *Helichrysum cassianum*, *Phytochemistry*, 47, 1441-1443.

EKLER DİZİNİ

EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN DİLÜSYON SIVISI VE BESİYERLERİ

Serum Fizyolojik

Ardışık dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

8,5 g NaCl, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda (9 mL) dağıtılarak otoklavda, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir. Çözelti buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Temiz, 2000).

Tryptic Soy Broth (TS Broth)-MERCK Cat. No. 1.05459

Gerek mikroorganizmaların geliştirilmesinde ve gerekse antibakteriyel etkinin tespitinde inkübasyon sürecinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	g/L
Kazein peptonu	17
Soya peptonu	3
D (+) glukoz	2,5
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2,5
<u>Damıtık su</u>	<u>1L</u>

Ph: 7.3 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 30 g tartılarak 1 L damıtık su içinde çözülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 2000).

Tryptic Soy Agar (TS Agar)

Mikroorganizmaların geliştirilmesi ve koloni oluşturan birim sayısının tespitinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	g/L
Kazein peptonu	17
Soya peptonu	3
D (+) glukoz	2,5
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2,5
Agar	15
<u>Damıtık su</u>	<u>1L</u>

pH: 7.3 ± 0.2

Hazırlanışı:

30 g tartılan hazır TS Broth besiyeri üzerine 15 g agar eklenerek hazırlanan karışım, 1L damıtık su içinde çözdürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara ya da test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, erlen, balon gibi cam kaplardaki besiyeri steril Petri kaplarına alev çatısı altında dökülür ve katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren Petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır. Besiyerini içeren tüpler de buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon.,2000, Temiz, 2000).

EK 2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

18-24 saatlik kültür ile yürütülen ekstrakt çalışmalarının içiçe faktörlü Denemelerde Varyans Analizi sonuçları

Bağımlı değişken: logaritmik sayım sonucu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	141,546(a)	335	,423	53,766	,000
Intercept	81534,267	1	81534,267	1037516,3346	,000
madde	50,597	7	7,228	919,774	,000
zaman(kons(madde))	59,770	280	,213	27,163	,000
kons(madde)	31,179	48	,650	82,655	,000
Error	5,281	672	7,859E-03		
Total	81681,094	1008			
Corrected Total	146,827	1007			

a R Squared = ,964 (Adjusted R Squared = ,946)

18-24 saatlik kültür ile yürütülen H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonlarının çalışmaları için içiçe faktörlü Denemelerde Varyans Analizi sonuçları

Bağımlı değişken: logaritmik sayım sonucu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	48,265(a)	293	,165	72,688	,000
Intercept	70342,449	1	70342,449	31039726,333	,000
madde	9,393	6	1,566	690,804	,000
zaman(kons(madde))	33,160	245	,135	59,724	,000
kons(madde)	5,712	42	,136	60,014	,000
Error	1,333	588	2,266E-03		
Total	70392,047	882			
Corrected Total	49,598	881			

a R Squared = ,973 (Adjusted R Squared = ,960)

Seyreltilmiş kültür ile yürütülen ekstrakt çalışmalarının İççe faktörlü Denemelerde Varyans Analizi sonuçları

Bağımlı değişken: logaritmik sayım sonucu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2209,135(a)	335	6,594	1966,515	,000
Intercept	66213,617	1	66213,617	1974545 6,192	,000
madde	43,348	7	6,193	1846,686	,000
zaman(kons(madde))	2081,334	280	7,433	2216,683	,000
kons(madde)	84,453	48	1,759	524,679	,000
Error	2,253	672	3,353E-03		
Total	68425,006	1008			
Corrected Total	2211,389	1007			

a R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,998)

Seyreltilmiş kültür ile yürütülen H.Ç.E. ekstraktı fraksiyonlarının çalışmalarının İççe faktörlü Denemelerde Varyans Analizi sonuçları

Bağımlı değişken: logaritmik sayım sonucu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2530,030(a)	419	6,038	2762,715	,000
Intercept	85712,168	1	85712,168	3921633 0,268	,000
madde	2,255	9	,251	114,648	,000
zaman(kons(madde))	2522,948	350	7,208	3298,107	,000
kons(madde)	5,010	60	8,350E-02	38,204	,000
Error	1,829	837	2,186E-03		
Total	88318,162	1257			
Corrected Total	2531,859	1256			

a R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,999)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşegül Demir

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1979

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1994-1997 Ankara Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi

Lisans :1997-2002 Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi: 2004-.....Araş.Gör. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü