

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ESANSİYEL YAĞLARIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE
ESCHERICHIA COLI ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu TURHAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER

MAYIS 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ESANSİYEL YAĞLARIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE
ESCHERICHIA COLI ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Duygu TURHAN
(506121506)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER

MAYIS 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506121506 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Duygu TURHAN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**BAZI ESANSİYEL YAĞLARIN STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE ESCHERICHIA COLI ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. B. İrem OMURTAG KORKMAZ
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : **4 Mayıs 2015**
Savunma Tarihi : **28 Mayıs 2015**

Her şeyim Aileme,

ÖNSÖZ

Günümüzde gıda güvenliğinin sağlanması giderek büyüyen bir sorundur. Tüketicilerin kimyasal katkı maddeleri hakkındaki önyargıları, araştırmacıları doğal antimikrobiyal ajanlara yönlendirmiştir. Bu çalışmada bitkilerden elde edilen doğal esansiyel yağların gıda kaynaklı patojenlerden *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü yardımda bulunan, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER'e çok teşekkür ederim.

Çalışmam süresince yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan, pozitif enerjileriyle beni mutlu eden Utku Anıl BAŞTAŞ, Nihal DURMUŞ ve diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen benimle birlikte üzüldüğüm her şeyim, canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığım esansiyel yağların teminini sağlayan IFF Aroma Esans Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Kocaeli)'ne teşekkür ederim.

Mayıs 2015

Duygu Turhan
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Esansiyel Yağların Genel Özellikleri	3
2.2 Esansiyel Yağların Kimyasal Özellikleri	3
2.3 Esansiyel Yağların Antimikrobiyal Aktivitesi	5
2.3.1 Etki mekanizması	8
2.3.2 Antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili faktörler	10
2.3.2.1 Gıdanın/Besiyerinin özellikleri	10
2.3.2.2 Esansiyel yağların özellikleri	11
2.3.2.3 Mikroorganizmaların özellikleri	12
2.3.2.4 Diğer faktörler	13
2.4 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	14
2.4.1 Dilüsyon yöntemi	14
2.4.1.1 Broth dilüsyon yöntemi	15
2.4.1.2 Agar dilüsyon yöntemi	15
2.4.2 Difüzyon yöntemi	15
2.4.2.1 Disk difüzyon yöntemi	16
2.4.2.2 Agar kuyucuk difüzyon yöntemi	16
2.5 Mikroorganizmalar	17
2.5.1 Staphylococcus aureus	17
2.5.2 Escherichia coli	19
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1 Materyal	21
3.1.1 Mikroorganizmalar	21
3.1.2 Esansiyel yağlar	21
3.1.3 Besiyerleri ve çözeltiler	21
3.2 Metot	21
3.2.1 Bakteri süspansiyonunun hazırlanması	21
3.2.2 Antimikrobiyal etki çapının belirlenmesi	21
3.2.3 Mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinin belirlenmesi	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1 Farklı esansiyel yağların <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> üzerine inhibisyon etkisinin değerlendirilmesi	25
4.2 Farklı Esansiyel Yağların <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> Gelişimine Etkisi	32

4.2.1 Esansiyel yağ konsantrasyonunun <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.....	35
4.2.1.1 Kekik	35
4.2.1.2 Kimyon.....	37
4.2.1.3 Kakule	39
4.2.1.4 Mercanköşk	40
4.2.2 Esansiyel yağ konsantrasyonunun <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi	43
4.2.2.1 Kekik	43
4.2.2.2 Kimyon.....	45
4.2.2.3 Kakule	46
4.2.2.4 Mercanköşk	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	55
EKLER.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	85

KISALTMALAR

DMSO	: Dimetil sülfoksit
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MBK	: Minimum bakterisidal konsantrasyon
OD	: Optik yoğunluk
GC	: Gaz kromatografisi
MS	: Kütle spektrometresi
ΔpH	: pH gradienti
$\Delta\Psi$: Elektrik potansiyeli
TSA	: Trypticase Soy Agar
MHB	: Müeller Hinton Broth
NaCl	: Sodyum klorür

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Baharat, şifalı ot ve diğer bitkilerde bulunan antimikrobiyal etkiye sahip bileşenler.	4
Çizelge 2.2 : Bazı esansiyel yağların <i>E. coli</i> üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler.	5
Çizelge 2.3 : Bazı esansiyel yağların <i>S. aureus</i> üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler.	6
Çizelge 2.4 : Bazı esansiyel yağların <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> üzerine antimikrobiyal etki çapının araştırıldığı literatür çalışmalarına örnekler.....	7
Çizelge 4.1 : <i>E. coli</i> 'nin gelişimi üzerine esansiyel yağların etkisi.	25
Çizelge 4.2 : <i>S. aureus</i> 'un gelişimi üzerine esansiyel yağların etkisi.....	27
Çizelge 4.3 : Esansiyel yağların <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> üzerine aktiflik değerlendirmesi.	32
Çizelge 4.4 : Kekik, kakule, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağlarının optik yoğunluk ölçümüyle belirlenen MİK ve MBK değerleri.	33
Çizelge 4.5 : Kekik, kakule, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağlarının bulanıklığın değerlendirilmesiyle belirlenen MİK ve MBK değerleri.	33
Çizelge 4.6 : Farklı konsantrasyonlardaki kekik esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.	36
Çizelge 4.7 : Farklı konsantrasyonlardaki kimyon esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.	38
Çizelge 4.8 : Farklı konsantrasyonlardaki kakule esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.	39
Çizelge 4.9 : Farklı konsantrasyonlardaki mercanköşk esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.....	41
Çizelge 4.10 : Farklı konsantrasyonlardaki kekik esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.....	43
Çizelge 4.11 : Farklı konsantrasyonlardaki kimyon esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.....	46
Çizelge 4.12 : Farklı konsantrasyonlardaki kakule esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.....	47
Çizelge 4.13 : Farklı konsantrasyonlardaki mercanköşk esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.....	49
Çizelge A.1 : Kekik esansiyel yağının <i>E. coli</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	68
Çizelge A.2 : Kimyon esansiyel yağının <i>E. coli</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	69
Çizelge A.3 : Kakule esansiyel yağının <i>E. coli</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	70
Çizelge A.4 : Mercanköşk esansiyel yağının <i>E. coli</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	71

Çizelge A.5 : Kekik esansiyel yağının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	72
Çizelge A.6 : Kimyon esansiyel yağının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	73
Çizelge A.7 : Kakule esansiyel yağının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	74
Çizelge A.8 : Mercanköşk esansiyel yağının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Esansiyel yağ bileşenlerinin bakteri hücresi üzerine etki mekanizması: hücre duvarının degridasyonu, hücre zarının zarar görmesi, membran proteinlerinin zarar görmesi, hücre bileşenlerinin sızıntısı, sitoplazmanın koagülasyonu, proton hareket gücünün azalması.....	9
Şekil 3.1 : Yağların seyreltilmesi.....	23
Şekil 4.1 : Esansiyel yağların <i>E. coli</i> üzerine etkisi.....	26
Şekil 4.2 : Esansiyel yağların <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.	28
Şekil 4.3 : Kekik esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin inaktivasyonu.....	36
Şekil 4.4 : Kimyon esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin inaktivasyonu.	38
Şekil 4.5 : Kakule esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin inaktivasyonu.....	40
Şekil 4.6 : Mercanköşk esansiyel yağının etkisiyle <i>E. coli</i> 'nin inaktivasyonu.....	42
Şekil 4.7 : Kekik esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un inaktivasyonu.	44
Şekil 4.8 : Kimyon esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un inaktivasyonu.	46
Şekil 4.9 : Kakule esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un inaktivasyonu.	48
Şekil 4.10: Mercanköşk esansiyel yağının etkisiyle <i>S. aureus</i> 'un inaktivasyonu.	49
Şekil B.1: Kekik esansiyel yağının <i>E. coli</i> için MBK değerinin belirlenmesi.....	76
Şekil B.2: Kimyon esansiyel yağının <i>E. coli</i> için MBK değerinin belirlenmesi.....	77
Şekil B.3: Kakule esansiyel yağının <i>E. coli</i> için MBK değerinin belirlenmesi.	78
Şekil B.4: Mercanköşk esansiyel yağının <i>E. coli</i> için MBK değerinin belirlenmesi	79
Şekil B.5: Kekik esansiyel yağının <i>S. aureus</i> için MBK değerinin belirlenmesi.	80
Şekil B.6: Kimyon esansiyel yağının <i>S. aureus</i> için MBK değerinin belirlenmesi..	81
Şekil B.7: Kakule esansiyel yağının <i>S. aureus</i> için MBK değerinin belirlenmesi....	82
Şekil B.8 : Mercanköşk esansiyel yağının <i>S. aureus</i> için MBK değerinin belirlenmesi	83

BAZI ESANSİYEL YAĞLARIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE *ESCHERICHIA COLI* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Mikroorganizmalar gıdaların bozulmasına, ürün kalitesinin düşmesine ve hastalıklara neden olabilmektedir. Bu nedenle gıdaların korunmasında fiziksel ve kimyasal birçok yöntem kullanılmaktadır. Günümüzde tüketicilerde kimyasal koruyuculara karşı oluşan olumsuz düşünceler ve önyargılar, araştırmacıları doğal antimikrobiyal maddeleri araştırmaya yönlendirmiştir. Esansiyel yağların doğal olmaları ve toksisite göstermemeleri nedeniyle antimikrobiyal olarak kullanılabilceği yapılan bilimsel araştırmalarla kanıtlanmıştır.

Esansiyel yağlar farklı bileşenler içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden farklılık göstermektedirler. Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösteren çok sayıda esansiyel yağın antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu çeşitli araştırmalarca belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri, yapılarında bulunan fenolik (timol, karvakrol, öjenol vb.), terpenoid bileşenlerden, aldehitlerden ve organik asitlerden kaynaklanmaktadır. Bu bileşenlerin hücre membranının yapısını bozarak ve enzim sistemlerinin bozulmasına sebep olarak mikroorganizmaları öldürdüğü ifade edilmiştir.

Esansiyel yağların uçucu ve sudaki çözünürlüklerinin az olması ile karmaşık yapıları antimikrobiyal aktivitelerini analizlemeyi ve elde edilen bulguları değerlendirmeyi güçleştirmektedir. Bu nedenle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmakta ve aynı esansiyel yağ ile ilgili farklı bulgular elde edilebilmektedir.

Yapılan çalışmada ilk olarak dereotu, fesleğen, kakule, kekik, kimyon, mercanköşk, rezene ve zencefil esansiyel yağlarının *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak etki çaplarının karşılaştırılmasıyla incelenmiştir. Esansiyel yağların antimikrobiyal aktiviteleri ölçülen etki çaplarının büyüklüğüne göre değerlendirilmiştir. Agar kuyucuk difüzyon yönteminde çalışılan konsantrasyonlarda *E. coli*'ye karşı fesleğen, zencefil ve rezene, *S. aureus*'a karşı ise zencefil ve rezene esansiyel yağları antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. Kekik ve mercanköşk diğer yağlara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterirken, her iki mikroorganizmaya karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi mercanköşk esansiyel yağı göstermiştir. 2,5-5-10-15 µL esansiyel yağ miktarlarında kekik ve mercanköşk esansiyel yağları *E. coli*'nin gelişimini tamamen engellerken; 2,5 µL esansiyel yağ miktarında dereotu, kimyon ve kakule sırasıyla; 8 mm, 10 mm, 7 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. *S. aureus*'un gelişimini, kakule esansiyel yağı 15 µL'de, dereotu esansiyel yağı ise 15 µL ve 10 µL'de engellerken; kekik, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağları 2,5 µL yağ miktarında dahi bakteri gelişimini tamamen inhibe etmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmı için *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren 4 esansiyel yağ (kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk) seçilmiştir. Kekik, kimyon, kakule, mercanköşk esansiyel yağları varlığında *E. coli* ve *S. aureus*'un gelişimi inkübasyon süresince belirli aralıklarla (0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18; 20; 22 ve 24 saat) izlenmiş; bakteri gelişimi, bakteri yoğunluğunun optik olarak ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Mikrodilüsyon yönteminin kullanıldığı çalışmada minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri görünür bulanıklığın olmadığı konsantrasyon olarak belirlenirken, mikroorganizmaların optik yoğunluğunun ölçülmesiyle de doğrulaması yapılmıştır. Bulanıklık tayini ve optik yoğunluk tayini ile *E. coli* ve *S. aureus* için belirlenen MİK değerleri kakule, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağlarında farklılık göstermiştir. Bulanıklık tayiniyle belirlenen MİK değerleri *E. coli* için kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 3,75 µL/mL, kekikte 0,93 µL/mL, mercanköşkte 0,46 µL/mL; *S. aureus* için ise kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla 3,75 µL/mL, 7,5 µL/mL, 15 µL/mL, 0,93 µL/mL'dir. Optik yoğunluk ölçümüyle belirlenen MİK değerleri *E. coli* için kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 7,5 µL/mL, mercanköşk esansiyel yağında 0,93 µL/mL iken; *S. aureus* için belirlenen MİK değerleri ise kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla 15 µL/mL, 30 µL/mL, 1,87 µL/mL'dir. Bulanıklık tayiniyle belirlenen MİK değerleri, optik yoğunluğa göre belirlenen değerlerden daha yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Kekik esansiyel yağında ise her iki yöntemle de belirlenen MİK değeri aynıdır ve *E. coli* için 0,93 µL/mL, *S. aureus* için 3,75 µL/mL'dir.

MİK değerinin belirlendiği mikropaklardan petri kutularına ekim yapılmış ve inkübasyon sonucunda minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. MBK değerleri *E. coli* için kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarında 0,93 µL/mL, kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 7,5 µL/mL; *S. aureus* için ise kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla 3,75 µL/mL, 15 µL/mL, 30 µL/mL, 1,87 µL/mL belirlenmiştir.

S. aureus'a karşı en düşük MİK ve MBK değeri mercanköşk esansiyel yağında belirlenirken, *E. coli*'ye karşı en düşük MİK ve MBK değeri mercanköşk ve kekik esansiyel yağlarında belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkinliği en düşük olan esansiyel yağ *E. coli* için kakule ve kimyon, *S. aureus* için ise kakule esansiyel yağı olarak belirlenmiştir. Kakule, kimyon, kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarının her birinde *S. aureus* için belirlenen MİK ve MBK değerleri, *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu için *S. aureus*'un *E. coli*'ye göre bu yağlara karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF SOME ESSENTIAL OILS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *ESCHERICHIA COLI*

SUMMARY

Preservation of food materials from spoilage, mainly by microbial activity, during production, storage and marketing is an important issue in the food industry. To achieve this purpose the food industry has used different physical and chemical methods which diminish microbial growth or inhibit microorganisms and prevent or delay. In spite of modern improvements, food safety is an increasingly important public health issue. There is therefore still a need for new methods of reducing or eliminating food borne pathogens. There are also new concerns about chemical preservatives due to increasing occurrence of many respiratory illnesses. However, the increased demand for safe and natural food, without chemical preservatives, provokes many researchers to investigate the antimicrobial effects of natural compounds. Numerous investigations have confirmed the antimicrobial action of essential oils.

Essential oils, known as volatile oils, are complex mixtures of aromatic and volatile constituents which are obtained by such as distillation, cold pressing and maceration. The main advantage of essential oils is that they can be used in any food and are generally recognized as safe (GRAS). Although, they are GRAS, the application of essential oils is limited because of organoleptic changes in food. However, the stereochemistry, lipophilicity and other factors affected the biological activity of these compounds which might be altered positively or negatively by slight modifications.

Essential oils can comprise more than sixty individual components. Major components can constitute up to 85% of the essential oils, whereas other components are present only as a trace. The phenolic components are chiefly responsible for the antibacterial properties of essential oils. There is some evidence that minor components have a critical part to play in antibacterial activity, possibly by producing a synergistic effect between other components.

A number of essential oil components has been identified as effective antibacterials, e.g. carvacrol, thymol, eugenol. They affect microbial cells by various antimicrobial mechanisms, including attacking the phospholipid bilayer of the cell membrane and disrupting enzyme systems. Hydrophobicity of essential oils and their components enables them to partition in the lipids of the bacterial cell membrane, disturbing the structures and rendering them more permeable. Leakage of ions and other cell contents can then occur. Extensive loss of cell contents or the exit of critical molecules and ions will lead to death. In a study, how mustard essential oil affected the cell membrane of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi* was investigated. Intracellular pH and ATP concentration and the release of cell

constituents were measured when mustard essential oil was in contact with *E. coli* and *S. typhi* at its minimal inhibitory concentration (MIC) and maximal tolerated concentration (MTC). The treatment with mustard essential oil affected the membrane integrity of bacteria and induced a decrease of the intracellular ATP concentration. Also, the extracellular ATP concentration increased and a reduction of the intracellular pH was observed in both bacteria. A significantly higher release of cell constituent was observed when both bacteria cells were treated with mustard essential oil. Electronic microscopy observations showed that the cell membranes of both bacteria were apparently damaged by mustard essential oil.

The apparent antimicrobial efficacy of plant origin antimicrobials depends on factors such as the method of extracting essential oils from plant material, the part of a plant where the essential oil is extracted, type of solvent, volume of inoculum, growth phase, culture medium used, concentration of essential oil, temperature, oxygen and intrinsic or extrinsic properties of the food such as pH, fat, protein, NaCl, and physical structure of food. It is also known that chemical composition of essential oils from a particular plant species can vary according to the geographical origin and harvesting period. In a study the effects of plants space and time of harvesting, plant height, plant diameter, yields of dry and fresh herbage, content (%) and yield of oil, thymol and carvacrol were measured. Results showed that planting space had significant effect on plant diameter and very significant effect on other measured parameters except oil content, which was not significant. Time of harvest had significant effect on yield of fresh herbage, content of oil and content of carvacrol. Its effect on other parameters was very significant except dry herbage and oil yield. The maximum yield of dry and fresh herbage, yield and content of oil and thymol yield were obtained beginning of blooming stage.

Tests of antimicrobial activity can be classified as diffusion and dilution methods. Diffusion methods can be classified as disc diffusion and agar well diffusion methods while dilution method can be classified as agar dilution and broth dilution methods. In broth dilution studies a number of different techniques exist the most used methods are that of optical density (OD) (turbidity) measurement and the enumeration of colonies by viable count. The obtained results are more sensitive than agar dilution method. The principles and practice of these test are explained in the literature but it appears that no standardised test has been developed for evaluating the antibacterial activity of essential oils against food-related microorganisms. Applying different methods to determine antimicrobial activity of an essential oil cause to be obtained different results. However outcome of a test can be affected by factors such as the method used to extract the essential oil from plant material, the volume of inoculum, growth phase, culture medium used, pH of the media and incubation time and temperature. Therefore comparison of published data is complicated.

Dilution methods are usually used to obtain minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). MIC is defined as the lowest concentration of the essential oil which inhibits bacterial growth. MBC is defined as concentration where 99.9% or more of the initial inoculum is killed.

The aim of this study was to determine the antimicrobial activity of some essential oils (dillweed, cardamon, basil, thyme, cumin, origanum, fennel and ginger essential oils) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and to determine the MIC and MBC values of the selected essential oils.

In this study, dillweed, cardamon, basil, thyme, cumin, organum, fennel and ginger essential oils were studied for their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by agar well diffusion method. The results revealed that although some of the essential oils didn't show any antimicrobial activity against tested strains in the studied concentration range, most of them showed antimicrobial activity with varying levels. The activity of dillweed, cardamon, thyme, cumin and organum essential oils against *E. coli* became apparent in the petri dishes with the emergence of a circular area of inhibition. On the contrary, no antibacterial activity was observed for basil, ginger and fennel essential oils against *E. coli* and for ginger and fennel essential oils against *S. aureus*. Thyme and organum essential oils showed higher antimicrobial activity than the other essential oils. However, organum essential oil showed the highest inhibitory activity against both bacterial species tested. The obtained inhibition diameters of essential oils against *E. coli* and *S. aureus* were in the range of 7-21 mm and 10-51 mm, respectively. *E. coli* and *S. aureus* had been completely inhibited by using 2.5 μL , 5 μL and 10 μL thyme and organum essential oils.

Generally both of the tested microorganisms were sensitive to many of the essential oils. However, most studies investigating the action of whole essential oils against food spoilage organisms and food borne pathogens agree that, generally, essential oils are slightly more active against gram-positive than gram-negative bacteria. Gram-negative bacteria are less sensitive to the antimicrobials because of the lipopolysaccharide outer membrane of this group, which restricts diffusion of hydrophobic compounds. In this study the results show that gram-negative *E. coli* is less sensitive than gram-positive *S. aureus*, too. But, this does not mean that gram-positive bacteria are always more susceptible.

In the second part of this study 4 essential oils (thyme, cumin, cardamon and organum essential oils) which showed antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* were selected. Inhibitory effect of these selected essential oils were monitored during incubation period (0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18, 20; 22 and 24 h) and the bacterial growth was determined by measuring optical density (OD) at 600 nm. Microdilution method was used to determine MIC. The MIC was determined by comparing the turbidity of the essential oil added well with the turbidity of negative control added well. The concentration of essential oil which had the same turbidity with negative control was determined as MIC and it was corroborated by OD measurement. However, MIC values of cumin, cardamon and organum essential oils which were obtained by visual turbidity measurement differed from MIC values which were obtained by microplate assay. The obtained MIC values against *E. coli* and *S. aureus* of selected essential oils by turbidity measurement were in the range of 0.46-3.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.93-15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. The MIC values found for microplate assay was always lower than those found in turbidity measurement because of its sensitivity. In this method obtained MIC values of *E. coli* and *S. aureus* were in the range of 0.93-7.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.93-30 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively.

To determine the MBC, broth was taken from each well, spread on Mueller Hinton Agar (MHA) at which the microorganism did not show visible growth. MBC values of thyme and organum essential oils against *E. coli* were 0.93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and cumin and cardamon essential oils were 7.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, MBC values of thyme, cumin, cardamon and organum were 3.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 1.87 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively.

Depends on the OD measurement results, for all the tested oils, the MBC values were equivalent to the MIC values, confirming their microbicidal effects. The lowest MIC and MBC values were obtained from organum essential oil against *S. aureus*. However, the lowest MIC and MBC values against *E. coli* were obtained from thyme and organum essential oils. Cumin and cardamon showed the lowest antimicrobial effect against *E. coli* as cardamon had showed the lowest antimicrobial activity against *S. aureus*.

1. GİRİŞ

Gıdaların üretilmesi ve korunmasında gıdaların ışınlanması, modifiye atmosfer paketlenme gibi modern uygulamalar kullanılmasına karşın gıda güvenliğinin sağlanması giderek büyüyen bir sorundur (WHO, 2002a). Gıdalarda canlı kalan mikroorganizmalar gıdaların bozulmasına, ürün kalitesinin düşmesine ve hastalıklara neden olabilmektedir (Jacob ve diğ., 2010). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre sanayileşmiş ülkelerde yaşayan insanların her yıl %30 kadarının gıda kaynaklı hastalıklara maruz kaldığı ve yapılan bir araştırmaya göre dünya çapında en az 2 milyon insanın diyareik hastalıklar nedeniyle öldüğü bildirilmiştir (WHO, 2002b).

Gıda güvenliğinin sağlanmasında kimyasal koruyucular yıllardan beri kullanılmaktadır. Fakat bu koruyucuların başta solunumla ilgili olmak üzere birçok hastalığa sebep olması gıdalarda kullanımlarında tartışmaya yol açmaktadır (Fleming-Jones ve diğ., 2003). Ayrıca tüketicilerin kimyasal katkı maddeleri hakkındaki olumsuz düşüncelerindeki ve önyargılarındaki artış, gıda güvenliğini sağlamada bitkisel kaynaklı yeni antimikrobiyal ajanların araştırılmasına neden olmuştur (Goni ve diğ., 2009).

Esansiyel yağların, bakteri, küf ve mayaların metabolik aktivitelerini inhibe eden bileşenler içerdiği bilinmektedir. Bu antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda sağlamayı başardığı ve gıdalarda doğal antimikrobiyal olarak kullanılabileceği yapılan bilimsel araştırmalarla kanıtlanmıştır (Souza ve diğ., 2005; Tajkarimi ve diğ., 2010). Esansiyel yağlarda terpenler ve fenilpropanlar başta olmak üzere çok sayıda, su buharında uçucu olan azot ve kükürt içeren bileşiklerin varlığı sayesinde gram-negatif bakteri, gram-pozitif bakteri, küf ve mayaların gelişimini ve toksin oluşumunu olumsuz yönde etkiledikleri düşünülmektedir (Ceylan, 1987). Esansiyel yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılıklar göstermektedirler. Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak pek çok esansiyel yağ farklı antimikrobiyal etkiler gösterebilmektedir (Toroğlu ve Çenet, 2006). Esansiyel yağların çoğu GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak sınıflandırılabilir, etkili

antimikrobiyal dozların organoleptik olarak kabul edilebilir seviyelerde olması gerekmektedir (Evren ve Tekgöler, 2011). Bu nedenle, gıdanın duyuşal özelliklerini etkilemeyecek, patojenik bakterilerin inhibisyonunu sağlayacak minimum esansiyel yağ konsantrasyonu belirlenmelidir.

Yenibahar, badem, defne, karabiber, karaman kimyonu, tarçın, karanfil, kişniş, kimyon, sarımsak, greyfurt, limon, mandarin, soğan, portakal, kekik, kuşburnu, adaçayı ve mercanköşk antimikrobiyal etkisi bilinen esansiyel yağlardır (Nychas ve Skandamis, 2003; Korukluoğlu ve diğ., 2005). Literatürde 1300'den fazla bitkinin antimikrobiyal etkisi olduğu rapor edilmektedir, ancak hepsinin gıdalarda kullanımı henüz mümkün olmamıştır. İstenilen antimikrobiyal etkiyi sağlayan dozlar duyuşal olarak kabul edilebilir sınırları aştığından gıdalarda koruyucu olarak kullanımları sınırlanmıştır (Gould, 1996; Cutter, 2000).

Bu çalışmada kekik, kakule, kimyon, zencefil, dereotu, fesleğen, mercanköşk ve rezene esansiyel yağlarının *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması ve antimikrobiyal olarak etkili bulunan bazı yağların seçilerek, ilgili yağın mikroorganizma gelişimini engelleyen en düşük konsantrasyonlarının bulunması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Esansiyel Yağların Genel Özellikleri

Esansiyel yağlar, bitkilerin çiçek, meyve, kabuk, yaprak, rizom, reçine ve odun kısımlarından çeşitli distilasyon ve ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen, genellikle oda sıcaklığında sıvı halde olan, uçucu, kuvvetli kokulu, su buharı ile taşınabilen karışımlardır (Karapınar ve Aktuğ, 1986; Korukluoğlu ve diğ., 2005).

Esansiyel yağların bitkide hangi amaçla salgılandığı tam olarak bilinmemekte ancak bitkinin yaralanmalara karşı oluşan reçinesi için çözücü görevi gördüğü sanılmaktadır. Bitkinin esansiyel yağı üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlemek amacıyla salgılandığı ve bitkiyi çeşitli doğal dış etkenlerden koruduğu da ileri sürülmektedir (Berk, 1953). Ayrıca yaydıkları kokular sayesinde böcekleri cezbederek tozlaşmaya yardımcı oldukları veya bunun tam tersi etki göstererek böcekleri bitkiden uzaklaştırarak bitkiyi korumada yardımcı olduğu da düşünülmektedir (Evans, 1996).

Esansiyel yağlar bitkinin hücreleri arasında bulunur. Önemli hormonlar burada bulunur. Dengeleyici ve dış etkenlere karşı bitkiyi koruyucudurlar (Kırbağ ve diğ., 2000).

Esansiyel yağlar geniş bir kullanım alanına sahiptir. Uzun yıllardan beri kozmetik, ilaç, gıda sanayi, aromaterapi ve fitoterapi başta olmak üzere bilimsel ve ticari birçok alanda kullanılmaktadır (Hammer ve diğ., 1999).

2.2 Esansiyel Yağların Kimyasal Özellikleri

Esansiyel yağlar distilasyon, soğuk presleme, maserasyon gibi farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilirler (Solórzano-Santos ve diğ., 2012). Bileşenlerinin detaylı analizleri ise genellikle gaz kromatografisi (GC) ve kütle spektrometresi (MS) ile yapılır (Delaquis ve diğ., 2002).

Esansiyel yağlar 60'dan fazla bileşenin farklı oranlarda birleşmesiyle oluşan doğal kompleks karışımlardır (Senatore, 1996; Russo ve diğ., 1998). Kimyasal bileşimleri, biyosentetik orjinleri temel alınarak terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri olarak iki geniş gruba ayrılabilirler. (Baytop 1986). Esansiyel yağın yapısını oluşturan ana bileşenler 2 ya da 3 tanedir ve bunların büyük çoğunluğunu terpenik maddeler oluşturmaktadır. Pek azı aromatik benzen türevlerinin terpenlerle karışımı halindedir (Baytop 1986; Senatore, 1996; Bauer ve diğ., 2001). Bu ana bileşenler yağın yaklaşık %85'ini oluştururken diğer bileşenler iz miktardadır (Senatore, 1996; Bauer ve diğ., 2001). Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi kimyasal yapılarına bağlıdır. Genellikle ana bileşenler esansiyel yağın biyolojik özelliklerini belirlerken bazı kekik türleri ve mercanköşkle yapılan bazı çalışmalar iz miktarda bulunan bileşenlerin de diğer bileşenlerle sinerjistik etki göstererek antibakteriyal aktivitede kritik rol oynadığını göstermiştir (Paster ve diğ., 1995; Marino ve diğ., 1999).

Çizelge 2.1 : Baharat, şifalı ot ve diğer bitkilerde bulunan antimikrobiyal etkiye sahip bileşenler (Davidson ve Naidu, 2000).

Baharat ve diğer bitkiler	Latince adı	Antimikrobiyal madde
Yenibahar	<i>Pimenta dioica</i>	öjenol
Fesleğen	<i>Ocimum basilicum</i>	d-linalool, methyl chavicol
Karabiber	<i>Piper nigrum</i>	monoterpenes, sesquiterpens
Defne	<i>Laurus nobilis</i>	cincol
Tarçın	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	cinnamic aldehyde
Karanfil	<i>Syzygium aromaticum</i>	öjenol
Kimyon	<i>Cuminum cyminum</i>	cuminaldehyde
Sarımsak	<i>Allium sativum</i>	diallyl disulfide
Soğan	<i>Allium cepa</i>	d-n-propyl disulfide, methyle-n-propyl disulfide
Mercanköşk	<i>Origanum vulgare</i>	timol, karvakrol
Maydanoz	<i>Petroselinum crispum</i>	alfa pinene, fenol-eter-apiol
Kuşburnu	<i>Rasmarinus officinalis</i>	borneol, cincol
Hardal	<i>Brassica hirta, B. nigra</i>	allyl, isothiocyanate
Adaçayı	<i>Salvia officinalis</i>	thujone, cincol, borneol
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	timol
Vanilya	<i>Vanilla planifolia, V. pompona</i>	vanillin

Karanfilde öjenol, sarımsakta allicin, mercanköşk ve kekikte karvakrol ve timol, tarçında sinamik aldehit ve öjenol, yenibaharda öjenol ve metil öjenol, kimyonda cumin aldehit, hardalda isothiocyanate, zencefilde gingerol ve gingeron, kuşburnunda timol, adaçayında borneol gibi fenolik bileşenlerin gıda kaynaklı patojenler ve mikotoksin oluşturan küfleri kapsayan geniş bir yelpazede bulunan

mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal özellik gösterdiği saptanmıştır (Valero ve Salmeron, 2003; Takikawa ve diğ., 2002; Tassaou ve diğ., 2004; Davidson ve Naidu, 2000).

2.3 Esansiyel Yağların Antimikrobiyal Aktivitesi

Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerini test etmek ve değerlendirmek genellikle zordur. Çünkü uçucu olmaları yanında sudaki çözünürlüklerinin az olması ve karmaşık yapıda olmaları deneyleri güçleştirmektedir. Yapılan çalışmalar esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerinin esansiyel yağ türüne, mikroorganizma çeşidine ve esansiyel yağ konsantrasyonuna göre değiştiğini göstermektedir. Ayrıca bazı esansiyel yağların gıdaların organoleptik özelliğinde kayba neden olmaksızın bakteriyel bozulmayı geciktirdikleri ve buna bağlı olarak koruyucu amaçla kullanılabileceğini saptamıştır (Giese, 1994; Hulin ve diğ., 1998; Üner ve diğ., 2000). Bazı esansiyel yağların Çizelge 2.2-2.3'te MİK ve MBK değerlerinin, Çizelge 2.4'te ise antimikrobiyal etki çaplarının araştırıldığı bazı literatür çalışmaları verilmiştir.

Çizelge 2.2 : Bazı esansiyel yağların *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler.

Esansiyel yağ	Yöntem	MİK / MBK	Referans
<i>Salvia officinalis</i> çiçeğinin esansiyel yağı	Mikrodilüsyon	MİK: 5,0-10,0 mg/mL MBK: >10,0 mg/mL	Delamare ve diğ., 2007
<i>Salvia triloba</i> çiçeğinin esansiyel yağı	Mikrodilüsyon	MİK: 5,0 mg/mL MBK: 7,0 mg/mL	Delamare ve diğ., 2007
<i>Thymus algeriensis</i> çiçeğinin esansiyel yağı	Mikrodilüsyon	MİK: 0,002 mg/mL MBK: 0,004 mg/mL	Giweli ve diğ., 2013
<i>Cinnamomum camphora</i> (Lauraceae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >1,6 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Eugenia caryophyllus</i> (Myrtaceae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >1,6 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Labiatae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >6,4 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Pelargonium graveolens</i> (Geraniaceae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >6,4 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe kökünün esansiyel yağı	Agar kuyucuk difüzyon	MİK: 173,84 mg/mL	Bellik, 2014
<i>Thymus vulgaris</i> bitkisi esansiyel yağı	Disk difüzyon	MİK: 2,9 mg/mL	Teixeria ve diğ., 2013
<i>Ocimum basilicum</i> bitkisi esansiyel yağı	Disk difüzyon	MİK: 4,6 mg/mL	Teixeria ve diğ., 2013
<i>Feronia limonia</i> meyvesi esansiyel yağı	Makrodilüsyon	MİK: 125 µg/mL	Senthikumar ve Venkatesalu, 2013
<i>Mentha rotundifolia</i> L. yapraklarının esansiyel yağı	Broth dilüsyon	MİK: 0,025 mL/mL MBK: 0,05 mL/mL	Riahi ve diğ., 2013

Çizelge 2.3 : Bazı esansiyel yağların *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler.

Esansiyel yağ	Yöntem	MİK / MBK	Referans
<i>Salvia officinalis</i> çiçeğinin esansiyel yağı	Mikrodilüsyon	MİK: 5,0-10,0 mg/mL MBK: >10,0 mg/mL	Delamare ve diğ., 2007
<i>Salvia triloba</i> çiçeğinin esansiyel yağı	Mikrodilüsyon	MİK: 0,3 mg/mL MBK: 0,4 mg/mL	Delamare ve diğ., 2007
<i>Thymus algeriensis</i> çiçeğinin esansiyel yağı	Mikrodilüsyon	MİK: 0,002 mg/mL MBK: 0,003 mg/mL	Giweli ve diğ., 2013
<i>Cinnamomum camphora</i> (Lauraceae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: 3,2 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Eugenia caryophyllus</i> (Myrtaceae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >6,4 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Labiatae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >12,8 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Pelargonium graveolens</i> (Geraniaceae) bitkisi esansiyel yağı	Agar dilüsyon	MİK: >12,8 mg/mL	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
<i>Zingiber officinale</i> kökünün esansiyel yağı	Agar kuyucuk difüzyon	MİK: 8,69 mg/mL	Bellik, 2014
<i>Feronia limonia</i> meyvesi esansiyel yağı	Makrodilüsyon	MİK: 31 µg /mL	Senthilkumar ve Venkatesalu, 2013
<i>Mentha rotundifolia</i> L. yapraklarının esansiyel yağı	Broth dilüsyon	MİK: 0,1 mL/mL MBK: 0,2 mL/mL	Riahi ve diğ., 2013
<i>Foeniculum vulgare</i> çekirdeklerinin esansiyel yağı	Broth dilüsyon	MİK: >10,0 mg/mL	Diao ve diğ., 2014

Çizelge 2.4 : Bazı esansiyel yağların *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etki çapının araştırıldığı literatür çalışmalarına örnekler.

Esansiyel yağ	Yöntem	Disk/Kuyucuk çapı	Miktar	Etki çapı		Referans
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
Zencefil (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe) esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	3 µL	40 mm	30 mm	Bellik, 2014
Fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i>) esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	15 µL	11,4±0,6 mm	22,2±1,3 mm	Hussain ve diğ., 2008
Fesleğen esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	50 µL	1/1: 10,5±0,5 mm 1/5: 8,2±0,5 mm	1:1 =10,3±0,5 mm 1:5 =8,3±0,5 mm	Prabuseenivasan ve diğ., 2006
Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>) tohumunun esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	100 µL	19,1±2,2 mm	11,5±0,7 mm	Diao ve diğ., 2014
Mercanköşk (<i>Origanum minutiflorum</i>)	Disk difüzyon	5 mm	10 µL	1/1: 29 mm 1/5: 26 mm 1/10: 22,5 mm	1/1: 26 mm 1/5: 22 mm 1/10: 20 mm	Şarer ve diğ., 1996
Kekik esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	20 µL	47 mm		Teixeria ve diğ., 2013
Kekik (<i>Thymus maroccanus</i>) esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	10 µL	30,7±1,1 mm	25,7±1,5 mm	Fadli ve diğ., 2012
Kekik (<i>Thymus broussonetii</i>) esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	10 µL	25,3±0,6 mm	22,7±1,5 mm	Fadli ve diğ., 2012
Kimyon (<i>Cuminum cyminum</i> L.) tohumunun esansiyel yağı	Disk difüzyon	6 mm	5 µL 10 µL	15,66±0,2 mm 18,33±0,3 mm	14±0,72 mm 18,33±0,53 mm	Haşimi ve diğ., 2014
Kakule (<i>Elettaria cardamomum</i>) asetonik ekstraktı	Agar kuyucuk difüzyon	6 mm	10 µL	14 mm	19,3 mm	Aneja ve Sharma (2010)

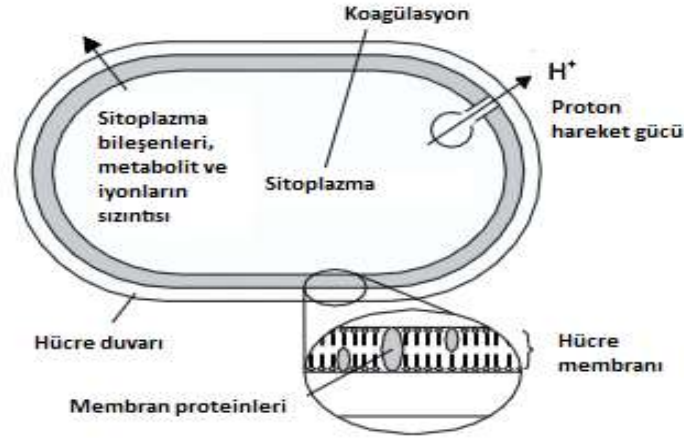
2.3.1 Etki mekanizması

Bazı esansiyel yağlar antibakteriyel, antifungal ve antioksidan aktivitelere sahiptir. Yüksek bitkilerden elde edilen antimikrobiyal etkili esansiyel yağların çoğu bir hidroksil grup içeren fenol yapısındaki bileşiklerdir (Van de Braak ve Leijten, 1999). Bunların antimikrobiyal aktiviteleri, yapılarında bulunan fenolik (timol, karvakrol, öjenol vb.), terpenoid bileşenlerden, aldehitlerden ve organik asitlerden kaynaklanmaktadır (Başer ve diğ., 2004; Davidson ve Naidu, 2000). Bu fenolik bileşikler, mikroorganizmaların enzim sistemlerinin bozulmasına sebep olarak enzimatik reaksiyonlarını durdurabilir, çekirdek ve ribozomal seviyede enzim sentezini engelleyebilir, ortamdaki besin maddelerinin alımını engelleyebilir veya zarın yapısını değiştirerek hücre membranındaki fosfolipit tabakanın hassaslaşmasına ve geçirgenliğinin artmasına neden olabilir. (Rouro ve diğ., 2005; Coşkun, 2006; Lacroix ve diğ., 2006; Uçan, 2008). Mikroorganizma membranının yapısal ve fonksiyonel özelliklerine, proton hareket gücünün iki bileşenine etki ederek zarar verir: pH gradienti (ΔpH) ve elektrik potansiyeli ($\Delta\Psi$). İyonların, ATP, nükleik asit ve aminoasitlerin hücre dışına sızmasına neden olur. K^+ iyonunun dışarı akması genellikle hücrede görülen zararın erken işaretidir, bunu sıklıkla sitoplazmik yapıların dışarı akması takip eder. Proton hareket gücü dengesinin yok olması ve ATP havuzunun boşalması hücre ölümünün ana sebebidir (Ultee ve diğ., 2002; Holley ve Patel, 2005; Kotzekidou ve diğ., 2006).

Hücre zarının geçirgenliği, zarın kompozisyonuna ve zarı geçmeye çalışan maddenin hidrofobikliğine bağlıdır. Polar fenoliklerin suda çözünürlüklerinin yüksek olmaları nedeniyle hedef organizmaya temas etmesi kolaylaşır (Holley ve Patel, 2005). Ayrıca esansiyel yağların bileşimindeki aldehitler güçlü elektronegatiflik gösterir. Elektronegatif bileşikler, protein ve nükleik asit gibi yaşamsal azotlu bileşiklerle reaksiyona girerek mikroorganizma gelişimini inhibe eder ve yüksek antimikrobiyal etkinlik sağlar (Dorman ve Deans, 2000).

Genellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* gibi gram-pozitif bakterilerin, *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis gibi gram-negatif bakterilere göre esansiyel yağa karşı daha duyarlı olduğu düşünülür. Çünkü gram-pozitif bakterilerde esansiyel yağın hidrofobik bileşenlerinin hücre membranıyla doğrudan etkileşimi vardır (Soković ve diğ., 2010). Gram-negatif

bakterilerde ise tam tersine hidrofobik hücre duvarı olduğu için bu dış katmanın hidrofobik bileşenlerin penetrasyonunu önlediği ve dolayısıyla esansiyel yağlara karşı daha dayanıklı olması gerektiği düşünülmektedir (Ravichandran ve diğ., 2011; Kim ve diğ., 2011). Fakat turunçgil esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkinliği ile ilgili yapılan bir çalışma gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin bu esansiyel yağlara karşı aynı duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir (Deans& Ritchie, 1987). Yapılan başka bir çalışmada ise timol ve karvakrolün gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere farklı etki ettiği, karvakrol ve timolün gram-negatif bakterinin hücre duvarını parçaladığını, hücre membranının yapısındaki liposakkaritleri serbest bırakarak yapısını bozduğunu ve geçirgenliğini artırdığı bulunmuştur (Dorman ve Deans, 2000; Burt, 2004).



Şekil 2.1 : Esansiyel yağ bileşenlerinin bakteri hücresi üzerine etki mekanizması: hücre duvarının degradasyonu, hücre zarının zarar görmesi, membran proteinlerinin zarar görmesi, hücre bileşenlerinin sızıntısı, sitoplazmanın koagülasyonu, proton hareket gücünün azalması (Burt, 2004).

Turgis ve diğ. (2009), yaptıkları bir çalışmada hardal esansiyel yağının *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi bakterilerinin hücre membranına etkisini incelemiştir. Esansiyel yağın agar dilüsyon metoduyla bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonları ve minimum bakterisidal konsantrasyonları belirlenmiştir. *E.coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhi, hardal esansiyel yağının minimum inhibitör konsantrasyonları ve minimum bakterisidal konsantrasyonları uygulandığında, hücre içi pH ve ATP konsantrasyonları ile hücre bileşenlerinin salınımı ölçülmüş ve hücre yapısındaki değişiklikler elektron mikroskopuyla incelenmiştir. Hardal esansiyel yağının bakterilerin membran bütünlüğünü etkilediği

ve hücre içi ATP konsantrasyonunu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca her iki bakteride de hücre dışı ATP konsantrasyonunun arttığı, hücre içi pH'ın azaldığı ve hücre içi bileşenlerin hücre dışına yüksek miktarda geçtiği belirlenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler hücre membranının iki bakteride de hardal esansiyel yağı varlığıyla zarar gördüğünü ve bu yağın hücrenin homeostasisini bozduğunu göstermiştir.

Başka bir çalışmada rezene esansiyel yağının (*Foeniculum vulgare* Mill.) *Shigella dysenteriae* bakterisinin hücre membranının bütünlüğünü bozduğu, geçirgenliğini artırdığını dolayısıyla protein, indirgen şeker gibi hücre içi bileşenlerin yoğunluğunda azalmaya ve elektrolitlerin kaybına neden olduğu ifade edilmiştir (Diao ve diğ., 2014).

2.3.2 Antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili faktörler

2.3.2.1 Gıdanın/Besiyerinin özellikleri

Gıdanın/besiyerinin bileşimindeki yağ miktarı, proteinler, pH, NaCl içeriği gibi etmenler esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini etkilemektedir (Burt, 2004; Firouzi ve diğ., 2007; Friendly ve diğ., 2009).

Ortamda bulunan yağ varlığı ve yağın çeşidi esansiyel yağların antimikrobiyal özelliklerini etkilemektedir. Defne, karanfil, tarçın ve kekik esansiyel yağlarıyla yapılan bir çalışmada, az yağlı ve tam yağlı peynirde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* Enteritidis'in 14 gün boyunca gelişimleri incelenmiştir. Az yağlı peynirde her 4 yağ da *Listeria monocytogenes* üzerine antimikrobiyal etkinlik gösterirken, tam yağlı peynirde sadece karanfil esansiyel yağı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Kekik yağı tam yağlı peynirde *Salmonella* Enteritidis'e karşı hiçbir etki göstermezken, az yağlı peynirde diğer 3 yağ kadar antimikrobiyal etkinlik göstermiştir (Smith-Palmer ve diğ., 2001).

Protein içeriği esansiyel yağın etkinliğini azaltmaktadır. Antimikrobiyal bileşen gıdanın bileşiminde bulunan proteinler ile kompleks oluşturmaktadır. Bu durum antimikrobiyal etkiyi zayıflatmaktadır. Karbonhidratlar ise yağ ve protein kadar esansiyel yağlar üzerinde etkili değildir (Smith-Palmer ve diğ., 2001; Burt, 2004).

Antimikrobiyel etki mekanizması üzerine gıdanın pH'sı da önemlidir. Düşük pH'da esansiyel yağın hidrofobikliği, dolayısıyla gıdanın yağ fazında çözünme eğilimi

artmaktadır. Esansiyel yağ aynı zamanda bakterinin hücre zarının yağ fazında da çözüldüğü için bakteriyi inhibe edebilmektedir (Holley ve Patel, 2005). Lopez-Malo ve diğ. (2005), düşük pH'nın esansiyel yağın çözünürlüğünü ve stabilitesini artırarak antimikrobiyal aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir.

Ortamdaki NaCl miktarının artırılmasının esansiyel yağların aktivitesini artırdığı düşünülmektedir (Burt, 2004; Friedly ve diğ., 2009). Yapılan bir çalışmada tuz konsantrasyonunun artırılmasının *Salvia mirzayanii* bitkisinden elde edilen esansiyel yağın toplam fenolik bileşen miktarını artırdığı rapor edilmiştir (Valifard ve diğ., 2014). Yapılan başka bir çalışmada ortama NaCl ile mercanköşk ve karanfil esansiyel yağlarının *Listeria innocua* ve *Escherichia coli* üzerine etkisi incelenmiştir. 0,1 g/mL konsantrasyonundaki NaCl ile mercanköşk ve karanfil esansiyel yağları birlikte uygulandığında bakterilere karşı antimikrobiyal etki belirlenmemiştir. Ancak NaCl konsantrasyonu 5 g/100 mL olduğunda sadece NaCl bulunan ortamda herhangi bir antimikrobiyal aktivite gözlenmezken, karanfil esansiyel yağı ve NaCl'ün birlikte bulunduğu besiyerlerinde antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır (Witkowska ve diğ., 2014). Wendakoon and Sakaguchi (1993) de NaCl ve karanfil esansiyel yağının sinerjistik etki gösterdiğini, esansiyel yağın hücre membranının geçirgenliğini artırırken, NaCl'ün hücre içi enzimlere etki ederek mikroorganizmanın gelişimini engellediğini ifade etmişlerdir.

2.3.2.2 Esansiyel yağların özellikleri

Esansiyel yağın bileşimi, hasat zamanı ve ekstraksiyon yöntemi esansiyel yağın antimikrobiyal özelliklerini etkilemektedir.

Esansiyel yağların bileşimi, bitkilerin çiçek, yeşil kısım (yaprak ve sap), çekirdek, kök gibi hangi kısımdan elde edildiğine göre değişmektedir (Novak ve diğ., 2005; Olawore ve diğ., 2005). Kuropka ve diğ. (1991)'nin *Achillea ptarmica* bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen esansiyel yağlarda yaptıkları çalışmada bitkinin yeşil kısımlarından ve kökünden elde edilen yağdaki antimikrobiyal etkinliği sağladığı düşünülen mono-terpen miktarının, bitkinin çiçeklerinden elde edilen yağa göre çok daha az olduğunu bildirmiştir. Delaquis ve diğ. (2002) de kişniş (*Coriandrum sativum* L.) bitkisinin çekirdeklerinden elde edilen esansiyel yağ ile aynı bitkinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağ kompozisyonlarının farklı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan birçok çalışma bitkilerin özellikle öjenol, karvakrol

ve/veya timol fenolik bileşenlerini bulundurma oranının bakterisidal/bakteriyostatik özelliklerini etkilediği bilinmektedir (Gutierrez ve diğ., 2008; Rodríguez ve diğ., 2009).

Lopez-Malo ve diğ. (2000), aynı yıl içerisinde farklı zamanlarda hasat edilen limon otu bitkisinden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğinin değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Mayıs ile Aralık ayları arasında toplanan limon otundan elde edilen esansiyel yağ test edilen mikroorganizmaların %100'ünü inhibe ederken, Şubat ile Nisan ayları arasında toplanan limon otu esansiyel yağı ancak %73-80 oranında etkili olmuştur.

Badi ve diğ. (2004), kekikteki antimikrobiyal etkinliği sağladığı düşünülen timol miktarının, dikim sıklığından ve hasat zamanından etkilenme derecesini araştırmışlardır. Sonuç olarak antimikrobiyal etkinliğin dikim sıklığından etkilenmediğini fakat hasat zamanından etkilendiğini bulmuşlardır. Maksimum timol miktarının bitkinin çiçek açma safhasının başlarında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Esansiyel yağların elde edilme metodu esansiyel yağların kompozisyonunu değiştirdiği, dolayısıyla bu durumun esansiyel yağların antimikrobiyal özelliklerini de etkilediği düşünülmektedir. Packiyasothy ve Kyle 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada esansiyel yağların eldesinde kullanılan buhar distilasyon ve sıcak solvent ekstraksiyon metotlarını karşılaştırmışlardır. Çözücü olarak hekzan kullanılan solvent ekstraksiyon metoduyla elde edilen esansiyel yağın, buhar distilasyon metoduyla elde edilene göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.3.2.3 Mikroorganizmaların özellikleri

Mikroorganizmanın gram özellikleri, türü ve sayısı esansiyel yağın mikroorganizmalar üzerine aktivitesini etkilemektedir.

Gram-negatif bakterilerin hidrofilik hücre duvarı olduğu için, gram-pozitif bakterilere göre esansiyel yağlara karşı daha dayanıklı olduğu düşünülmektedir (Kim ve diğ., 2011; Ravichandran ve diğ., 2011). Fakat Deans ve Ritchie (1987), 50 esansiyel yağın 25 bakteri türüne karşı etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin, esansiyel yağlardan eşit oranda etkilendiklerini belirlemişlerdir. Esansiyel yağlar, farklı mikroorganizmalar üzerine farklı antimikrobiyal etkinlik göstermektedir. Örneğin *E. coli*, kimyon, kekik, karanfil,

biberiye ve adaçayı esansiyel yağlarına karşı *Pseudomonas fluorescens* veya *Serratia marcescens*'e karşı daha hassastır (Frag ve diğ., 1989). *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium, adaçayı ve damla sakızı esansiyel yağlarına karşı *Pseudomonas fragi*'ye göre daha dayanıklı iken, *Salmonella* Typhimurium kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarına karşı *Pseudomonas aeruginosa*'ya göre daha hassastır (Paster ve diğ., 1990).

Esansiyel yağlar ile mikroorganizma sayısı arasında herhangi bir korelasyon bulunmamaktadır. Fakat yapılan çalışmalar inokulum miktarı arttıkça mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan antimikrobiyal madde miktarının arttığını göstermektedir (Seow ve diğ., 2013).

2.3.2.4 Diğer faktörler

Esansiyel yağların etkisi konsantrasyon, sıcaklık ve oksijen varlığından da etkilenmektedir.

Sivropoulou ve diğ. (1996) esansiyel yağların antimikrobiyal etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Düşük konsantrasyonlarda enerji üretiminde görev alan enzimlere etki ederken, yüksek konsantrasyonlarda protein denatürasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Esansiyel yağlardaki aktif bileşenler çoğunlukla protein, yağ, tuz, karbonhidrat gibi gıda bileşenlerine bağlanmaktadır. Eklenen toplam esansiyel yağın sadece küçük bir kısmı serbest kalmakta ve antimikrobiyal etkinlik göstermektedirler (Davidson, 1997).

Depolama sıcaklığının düşürülmesinin esansiyel yağların aktivitesini artırdığı düşünülmektedir (Burt, 2004; Friedly ve diğ., 2009). Wanda ve diğ. (1976) düşük sıcaklığın esansiyel yağların çözünürlüğünü azalttığını ve membranın lipid fazının penetrasyonunu engellediğini söylemişlerdir. Friedman ve diğ. (2004), bazı esansiyel yağların, elma suyundaki *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Hadar üzerine antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Aktivitenin inkübasyon sıcaklığından ve depolama süresinden etkilendiğini, asitlikten ise etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Oksijen varlığı esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada mercanköşk esansiyel yağının mikroaerobik ve anaerobik ortamlarda inkübe edilen *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* Enteritidis üzerine etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aerobik ortamdaki antimikrobiyal aktivitenin daha düşük olduğunu ve düşük oksijenin bulunduğu ortamda esansiyel

yağda daha az miktarda oksidatif değişiklikler olduğunu göstermiştir (Paster ve diğ., 1990-1995).

2.4 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde uygulanan testlerin yöntem ve teknikleri literatürde belirtilmesine rağmen, gıda kaynaklı mikroorganizmalara karşı mevcut koruyucuların antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde standardize edilmiş testler bulunmamaktadır (Davidson ve Parish, 1989). Bu nedenle antibiyotikler için kullanılan antibakteriyal duyarlılık testleri esansiyel yağlara uyarlanmıştır. Fakat esansiyel yağın ekstraksiyonunda kullanılan yöntem, kullanılan inokulum miktarı, besiyeri, inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi birçok etmen analiz sonuçlarını etkilemektedir. Bu durum verilerin birbirleriyle karşılaştırılmasını da güçleştirmektedir (Janssen ve diğ., 1987; Rios ve diğ., 1988; Friedman ve diğ., 2002).

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde genel olarak kullanılan teknikler difüzyon ve dilüsyon yöntemleri olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir.

2.4.1 Dilüsyon yöntemi

Dilüsyon yöntemleri kantitatif sonuçlar verir. Testlerin sonuçlarını:

- I. İnokulumun yoğunluğu
- II. İnkübasyon süresi ve sıcaklığı
- III. Besiyeri
- IV. Antimikrobiyal maddenin stabilitesi

etkilemektedir (Rios ve diğ., 1988; Ötük, 1992).

Dilüsyon yöntemiyle esansiyel yağların MİK ve MBK değerleri bulunabilmektedir. Üremenin varlığı ya da yokluğu bulanıklık tayiniyle yapılmakta ve üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon değeri minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) olarak tanımlanmakta iken, başlangıçta inoküle edilenin %99.9'u veya daha çoğunu öldüren konsantrasyon ya da yeni besiyerine alındıktan sonra gelişmenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değeri olarak tanımlanmaktadır (Burt, 2004). MBK, MİK testinden sonra uygulanır. MİK testi sonucunda üremenin olmadığı tüplerden örnekler alınarak katı besiyerine

ekim yapılır. Katı besiyerinde üremenin olmadığı ilk besiyeri MBK değerini verir (Altuner, 2008).

Dilüsyon yöntemi, broth dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemi olmak üzere iki farklı şekilde yapılabilmektedir.

2.4.1.1 Broth dilüsyon yöntemi

Broth dilüsyon yöntemi makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Her iki yöntemin de prensibi aynıdır. Daha az miktarlarda çalışıldığı için mikrodilüsyon yöntemi, makrodilüsyon yöntemine göre daha ekonomiktir. Mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu plaklar, makrodilüsyon yönteminde ise steril tüpler kullanılarak, hazırlanan farklı konsantrasyonda esansiyel yağ veya diğer antimikrobiyal madde dilüsyonlarının, belirli konsantrasyondaki mikroorganizmaya karşı etkisi incelenmektedir. Kullanılan mikroorganizmaya karşı esansiyel yağın etkili konsantrasyonları ile; MİK ve MBK değerleri üremenin varlığına veya yokluğuna göre belirlenmektedir (İşcan ve diğ., 2002; Çelik ve Çelik, 2007). Üremenin gözlenmesinde, optik yoğunluk (OD) ölçümü ve canlı mikroorganizmaların sayımı en sık kullanılan yöntemlerdir. Elde edilen sonuçlar agar dilüsyon yöntemine göre daha hassastır (Mann ve Markham, 1998).

2.4.1.2 Agar dilüsyon yöntemi

Agar dilüsyon yönteminde esansiyel yağların farklı çözücüler kullanılarak belli sıcaklıkta ve henüz katılaşmamış agarda çözündürülmesi ile farklı konsantrasyonları hazırlanmaktadır. Petri kutularına dökümden ve agarın katılaşmasından sonra farklı miktarlarda inokulum (1-100 µL), nokta veya sürme ekim yöntemleriyle agar yüzeyine ekilmektedir. Agar dilüsyon yönteminde farklı ekim yöntemleri kullanılmasına rağmen elde edilen MİK değerleri yaklaşık olarak aynıdır (Farag ve diğ., 1989; Prudent ve diğ., 1995; Pintore ve diğ., 2002).

2.4.2 Difüzyon yöntemi

Teknik olarak basit bir yöntemdir, fakat analiz yapılırken analizin sonucunu etkileyecek aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir:

- I. Besiyeri saf hazırlanmalı.

- II. Kullanılan agarın tipi, konsantrasyonu ve petri kutusundaki kalınlığı aynı olmalı.
- III. Standart ve çalışılacak diğer suşların sıvı besiyerindeki süspansiyonunun bulanıklığı/konsantrasyonu standart olmalı.
- IV. Diskler/kuyucuklar mikroorganizma ekiminden sonraki 15 dk içinde yerleştirilmeli/açılmalı.
- V. Petri kutuları hemen inkübe edilmeli (Ötük, 1992).

2.4.2.1 Disk difüzyon yöntemi

Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem disk difüzyon yöntemidir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir ve Kirby- Bauer ismiyle de anılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antimikrobiyal maddenin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; agarlı besiyeri üzerine, çalışılacak uygun dilüsyondaki mikroorganizma kültüründen ekim yapılarak agarın bakteri süspansiyonunu emmesi sağlanmakta, ardından antimikrobiyal madde emdirilmiş steril diskler yerleştirilmektedir. Uygun sıcaklık ve inkübasyon süresi sonunda inhibisyon zon çapları ölçülerek yağın çalışılan mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etkisi değerlendirilmektedir (Adıgüzel ve diğ., 2005; Benli ve Yiğit, 2005). Ayrıca, esansiyel yağın bakteri hücre duvarına vereceği zararlanma ve hücre içerik kaybı elektron mikroskopuyla belirlenebilmektedir (Burt, 2004).

İnhibisyon zonunun çapı diskteki antimikrobiyal maddenin miktarı ve difüzyon yeteneği, petri kutularındaki agarın kalınlığı gibi etmenlere bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle bu yöntem, esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğin varlığının belirlenmesi için uygun olsa da elde edilen sonuçların yayımlanmış verilerle karşılaştırılması için uygun değildir (Deans ve diğ., 1993; Dorman and Deans, 2000).

2.4.2.2 Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

Çok sayıda esansiyel yağın ve/veya bakteri izolatının antimikrobiyal aktivitesinin gözlenmesinde sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem de agar kuyucuk difüzyon yöntemidir (Deans ve diğ., 1993; Dorman and Deans, 2000). Agar kuyucuk difüzyon

teknikinde, içinde test edilecek olan maddenin bulunduğu bir kuyucuk sistemiyle, test organizmasının bulunduğu uygun bir besiyeri kullanılmaktadır. Besiyeri üzerine, belirli çapta açılan kuyulara homojen olarak çözülmüş uçucu yağ karışımı koyulmaktadır. Kullanılan maddenin yapısal özelliği difüze olma yüzdesini veya süresini etkileyebilmekte bu durum da deney sonuçlarında da etkili olabilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda, kullanılan madde etkili ise çukurların etrafında belirgin biçimde üremenin olmadığı inhibisyon zonları oluşmaktadır. Oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek kaydedilmekte ve değerlendirilmektedir. Kuyucuklara koyulan maddenin artan ya da azalan konsantrasyonlarıyla, aktivite sonucu oluşan inhibisyon zonu çaplarının da doğru orantılı olarak artması ya da azalması beklenmektedir (Cowan; 1999; Dorman ve Deans, 2000).

2.5 Mikroorganizmalar

2.5.1 Staphylococcus aureus

Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. Staphylococcus terimi Grekçe staphyle (üzüm salkımı) tabirinden türetilmiştir ve karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı Alexander Ogston tarafından seçilmiştir (Waldvogel, 2000). Rosenbach 1884'te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Bu ayırım yakın zamana kadar devam etmiştir (Cengiz, 1999).

Stafilokoklar *Micrococcaceae* familyası içinde yer alan, katalaz pozitif, gram-pozitif koklardır. Yaklaşık olarak 1 mikrometre çapındadırlar. Tekli, ikili, dördü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı benzeri kümeler oluşturabilirler. *Staphylococcus aureus*'a ait koloniler geniş (6-8 mm çapında), düz, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı şeffaf görünümündedir. Çoğu suşa ait koloniler krem-sarı, portakal rengi pigmentasyon gösterirler. Çeşitli bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar. Uzun süre kültürde bekleyen bazı koklar hücre duvarı özelliklerinde değişiklikler olduğu için gram-negatifmiş gibi görünebilirler. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdürler. *S. aureus* koagulaz pozitifdir. Mannitole etki deneyi, koagulaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan

ayırt etmede en yararlı deneydir. Nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz negatiftirler (Cengiz, 1999; Waldvogel, 2000).

S. aureus hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda, optimum 37°C'de ve pH 7,4'te ürer. Stafilokoklar oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakteriler 60°C'de 30 dakika bekletince öldükleri halde stafilokoklar 1 saat bile canlılıklarını koruyabilirler (Bilgehan, 2000; Waldvogel, 2000).

Doğada oldukça yaygın olmakla birlikte tozda, toprakta, eşya üzerinde, insan ve hayvanlarda deri, ağız, geniz floralarında bulunurlar. *S. aureus* kökenlerinin %35-50'sinin enterotoksin oluşturabildikleri saptanmıştır. Deri ve mukoza enfeksiyonları, stafilokok pnömonisi ve besin zehirlenmesine neden olurlar (Bilgehan, 2000). Bakteriyel besin zehirlenmelerinin en sık görüleni, stafilokokal besin zehirlenmeleridir. Hastalık enterotoksinlerle kontamine gıdaların yenilmesi sonucu ortaya çıkar.

Stafilokokların farklı birçok gıdada canlı kalması, gelişmesi ve enterotoksin oluşturmasına neden olan başlıca etmenler; gıdanın içsel faktörleri (pH, su aktivitesi, koruyucular, yarışçı mikrobiyal flora) ile proses ve depolama dışsal faktörleri (sıcaklık, soğutma, ışınlama, dehidrasyon, paketleme, nem)'dir (Genigeorgis, 1989). İyi pişirme, uygun sıcaklıklarda tutma ve soğutma stafilokokal gıda zehirlenmelerini önlemede önemli faktörlerdir. Özellikle burun veya genizde mikroorganizma taşıyıcısı olan gıda çalışanlarının kontamine ettiği gıdaların tüketilmesiyle besin zehirlenmesi tablolarına yol açarlar. Gıdaların hazırlanması sürecinde ellerin yıkanması, dezenfeksiyonu, eldiven kullanımı, maske kullanımı, ekipmanların dezenfeksiyonu gibi temel hijyen faktörlerine uyulması kontaminasyon riskini azaltmaktır (Murray, 2005). Gıdaların yeterli sıcaklıkta (60°C ve üzeri) ve soğukta (7,2°C ve altı) tutulmaması ise stafilokokal zehirlenme riskini artırmaktadır. Çünkü *S. aureus* 6°C ve 46°C arasında gelişir ve toksin oluşturur. Bu nedenle gıdalar 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda pişirilmeli, 5°C ve altında depolanmalı, oda sıcaklığında tutulduğunda ise çabuk tüketilmelidir.

Besin zehirlenmelerinde tablo, stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar. Semptom ve bulgular genellikle 24 saat içinde düzelir. İyileşme tamdır. Enterotoksijenik stafilokok üremesine uygun ortam oluşturan besin maddeleri arasında uygun

olmayan koşullarda saklanmış jambon, patates, salam, dondurulmuş tavuk, süt tozu, yağ, krema ve mayonez sayılabilir (Cengiz, 1999; Bilgehan, 2000; Waldvogel, 2000).

2.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Dr. Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarında bulunmuştur ve ismi kalın bağırsakta bulunan bir bakteri olduğu için *Bacterium coli commune* konulmuştur. 19. yüzyılın sonlarına doğru *Escherichia* cins ismi olmuştur. 1950 yılına kadar insan ve hayvanların bağırsak sisteminde normal florada bulunan, patojen olmayan bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir. Gıda hijyeninde indikator mikroorganizma olarak kabul edilen ve fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilen *E. coli*; bazı serotiplerinin hastalıklara neden olduğunun ortaya çıkmasıyla potansiyel bir patojen olarak tanımlanmıştır (Doyle ve Cliver, 1990; Adams ve Moss, 1995; Yang ve Wang, 2014).

Escherichia coli, Enterobacteriaceae familyasına ait, gram-negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, peritrik flagellası ile hareketli bir bakteri olup insan ve çoğu sıcakkanlı hayvanların doğal bağırsak florasında bulunmaktadır. Bağırsak mikroflorasında en çok bulunan fakültatif anaerob bakteridir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). Ortalama 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm boyutlarındadır. Laktozu fermente ederler. Optimum gelişme sıcaklığı 37°C olup 7- 46°C arasında da çoğalabilir. 4.4-9.0 arasındaki pH değerlerinde canlılığını koruyabilmektedir. Minimum aw değeri 0.95'tir. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftirler. *E. coli* diğer Enterobacteriaceae üyelerinden birçok şekeri fermente edebilme özelliği ve diğer biyokimyasal testlerle ayırılmaktadır (Adams ve Moss, 1995; Bell ve Kyriakides, 2002).

E. coli'nin birçok suşları zararsız olmakla birlikte bazılarının, bağırsak florasında dengeyi ve besinlerin absorpsiyonunu sağlayarak konağa faydalı olduğu bilinmektedir. Ancak insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara neden olan patojen türleri de bulunmaktadır. Canlının savunma gücünün azaldığı durumlarda doku ve kana yayılarak enfeksiyon etkeni özelliği taşır. Bu patojen türler virülans özellikleri, patojenite mekanizmaları, klinik sendromlar ve O:H serotiplerine göre sınıflandırıldığında; enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvasiv (EIEC), enterohemorajik (EHEC), difuz-adhering (DAEC) ve entero-agregativ

(EaggEC) olmak üzere altı grupta toplanmaktadır (Halkman ve diğ., 2001; Yang ve Wang, 2014).

E. coli genel olarak özellikle çocuklarda diyare, hemorojik kolits, dizanteri, böbrek ve mesane enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, sepsisemi, hemolitik üremik sendrom, zatüre ve menenjitte neden olur (Coia, 1998; Bell ve Kyriakides, 2002). Özellikle *E. coli*'nin ETEC, EPEC, EAEC ve EHEC bakterilerinin bulaştığı gıdaların veya suyun tüketilmesi hastalıklara ve salgınlara sebep olmaktadır. Bulaşma dışkı-ağız yoluyla olduğu için el, su, yiyecek, içecek ve çevre temizliği kurallarına uyulması gerekir. *E. coli* O157:H7 en yoğun, en çok izole edilen ve en yüksek virülans özellik gösteren Verotoksijenik *E. coli* (VTEC)'dir. Patojenitesi mikroorganizmanın insanların bağırsak epitellerine bağlanıp, verotoksin olarak da bilinen Shiga toksini üretmesine bağlıdır (Duffy ve diğ., 2006). Shiga toksini üreten *E. coli*'nin çok düşük dozlarının bile hastalık oluşturmaya yeterli olduğu bilinmektedir (Karch ve diğ., 1999). Bu bakteri gıda endüstrisi açısından son zamanlarda esas tehlike olarak görülmektedir. İnsanlarda görülen *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının daha çok pişmemiş et ve sütlerden kaynaklandığı bilinmekle beraber dışkıyla kontamine olmuş et ve diğer gıdalar da bu suşun esas kaynağı olarak belirtilmektedir (Armstrong ve diğ., 1996; Jo ve diğ., 2004). Üretilen mamule uygulanan muhafaza yöntemleri gıdanın güvenliğini sağlamıyorsa, gıdaya *E. coli* O157:H7'nin yok edilmesini sağlayan bir işlem mutlaka uygulanmalıdır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 bakterileri kullanılmıştır.

3.1.2 Esansiyel yağlar

Dereotu (0,912 g/mL), kakule (0,899 g/mL), kekik (0,864 g/mL), fesleğen (0,956 g/mL), kimyon (0,929 g/mL), mercanköşk (0,94 g/mL), rezene (0,951 g/mL), zencefil (0,877 g/mL) esansiyel yağları IFF (International Flavors and Fragrance INC) Aroma Esans Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Gebze-Kocaeli) firmasından temin edilmiştir. Örnekler orijinal ambalajları içinde +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Besiyerleri ve çözeltiler

Çalışmada yatık Trypticase Soy Agar (TSA, MERCK No: 1.05458), Müeller Hinton Broth (MHB, MERCK No: 1.10293.0500), Agar Agar (MERCK No: 1.01613) ve farklı yağ konsantrasyonlarının ayarlanmasında %10’luk Dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisi kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Bakteri süspansiyonunun hazırlanması

Bakteriler yatık TSA’da çoğaltılmış ve 37°C’de 24 saat inkübe edilerek çoğaltılmıştır. İnkübasyon sonunda *E. coli*, *S. aureus*’un ayrı ayrı bakterileri konsantrasyonları 0,5 McFarland’a (10^6 kob/mL) peptonlu su ile ayarlanmıştır.

3.2.2 Antimikrobiyal etki çapının belirlenmesi

Antimikrobiyal etki çapı agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Kalemba & Kunicka, 2003). Petri kutularına 20’şer mL 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril

hale getirilen MHA dökülmüştür. Agar katılaştıktan sonra 0,5 McFarland bulanıklık standartı ile standardize edilmiş 100 µL bakteri süspansiyonunun petri kutularına ekimi yayma plak yöntemi ile yapılmıştır. Besiyerleri oda sıcaklığında 5-10 dk kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra besiyerlerine 6 mm çapındaki steril cork-borer delme setiyle, birbirlerine ve petri kutusunun kenarlarına eş uzaklıkta 3'er adet kuyucuk açılmıştır. Kuyucuklara test edilecek yağlar (dereotu, fesleğen, kakule, kekik, kimyon, mercanköşk, rezene, zencefil) farklı konsantrasyon ve miktarlarda eklenmiş ve besiyerleri 35°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Çalışma her mikroorganizma ve yağ için 2 paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Referans madde olarak 0,5 mg/mL konsantrasyonunda streptomisin kullanılmıştır. İnkübasyon sonucunda esansiyel yağların antimikrobiyal etki çapı (inhibisyon zonu) ölçülmüştür. 12.0 mm ve altında olan çaplar esansiyel yağın ilgili bakteri üzerine yeterli antibakteriyel etkiye sahip olmadığı (-), 12 ve 21 mm arasındaki çaplar orta derecede aktif (+), 21 ve 30 mm arasındaki çaplar aktif (++) , 30 mm ve üzerindeki çaplar ise çok aktif (+++) olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Djabou ve diğ., 2013).

3.2.3 Mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinin belirlenmesi

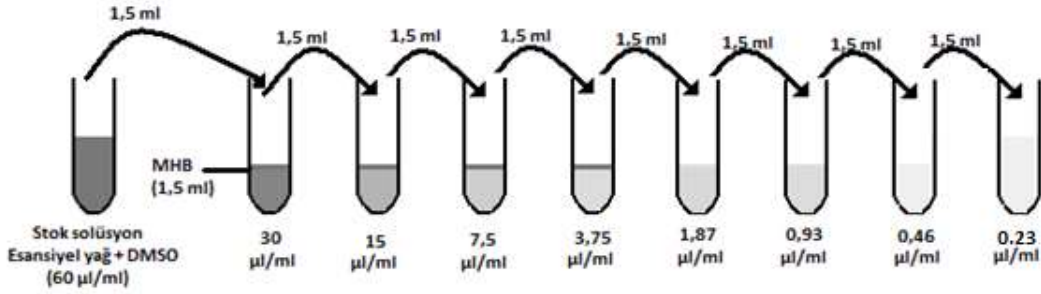
Antibakteriyel maddelerin in vitro etkinliğinin belirlenmesinde MİK ve MBK değerlerinden yararlanılmıştır. MİK mikroorganizmanın gelişmesine engel olan en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonudur. MBK ise mikroorganizmayı öldüren en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonudur (Arda, 2000).

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon çapları doğrultusunda *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı etkili 4 yağ seçilmiş, bu yağların antimikrobiyal etkisi inkübasyon süresince belirli aralıklarla (0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18; 20; 22 ve 24 saat) izlenmiş, MİK ve MBK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (Koneman ve diğ., 1997).

Esansiyel yağların stok solüsyonu %10 DMSO ile konsantrasyon 60 µL/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. MHB içeren steril test tüplerinde, her bir yağın ayrı ayrı seri dilüsyonu yapılarak ikişer kat azalan 0,23-30 µL/mL aralığında yağ konsantrasyonları elde edilmiştir.

Mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu plakların her birine 95 µL MHB konmuş, üzerlerine 5 µL 0,5 McFarland konsantrasyonunda *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri ilgili kuyucuklara ayrı ayrı ekilmiştir. Son olarak kuyucuklara 100 µL, seri dilüsyon

yöntemiyle konsantrasyonları ikişer kat azalan esansiyel yağlar sırasıyla eklenmiştir. Toplam olarak her bir kuyucukta 200 µL karışım (MHB + bakteri + esansiyel yağ) bulunmaktadır. 96 kuyucuklu plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. (Oke ve diğ., 2009).



Şekil 3.1 : Yağların seyreltilmesi.

Pozitif kontrol olarak 195 µL MHB ve 5 µL inokülüm karışımı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak çalışılan her konsantrasyon için 100 µL esansiyel yağ (%10 DMSO’da çözündürülmüş) ve 100 µL MHB karışımı kullanılmıştır. Çalışma her mikroorganizma ve her yağ konsantrasyonu için 3 paralel halinde gerçekleştirilmiştir (Oke ve diğ., 2009).

Bakteri gelişimi, bakteri yoğunluğunun optik olarak belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Bakterilerin optik yoğunluğu 600 nm de (Hu ve diğ., 2012), mikro plak okuyucu (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Okumalar inkübasyondan önce (0. saat), inkübasyon sırasında 2.; 4.; 6.; 8.; 10.; 12.; 18.; 20.; 22. saatte ve inkübasyon sonunda (24. saat) yapılmıştır. Her okumadan önce 96 kuyucuklu plaklar mekanik çalkalayıcıda (150 rpm) 20 dakika çalkalanmıştır (Gavanji ve diğ., 2014).

37°C’de 24 saat inkübasyon sonunda görsel olarak negatif kontrol ile aynı bulanıklığın belirlendiği kuyucuktaki esansiyel yağ konsantrasyonu mikroorganizmanın gelişmesini engelleyen MİK değeri olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile mikroorganizmaların optik yoğunluğu arasındaki fark göz önünde bulundurularak ikinci bir MİK değeri daha belirlenmiştir. Bulanıklık tayiniyle belirlenen MİK değeri, mikrolak okuyucu yardımıyla belirlenen MİK değeri ile karşılaştırılmış ve doğrulaması yapılmıştır.

MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla MHB ve Agar Agar kullanılarak MHA hazırlanmış ve sterilizasyon sonrasında petri kutularına yaklaşık 15 mL dökülmüştür. MHA içeren petri kutularına inkübasyon sonunda gelişme gözlenmeyen mikroplak kuyucuklarından 10 µL alınarak yayma plak yöntemi ile ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakteri gelişiminin olmadığı petri kutularındaki yağ konsantrasyonu MBK değeri olarak belirlenmiştir. Çalışma her mikroorganizmanın her konsantrasyonu için 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Hu ve diğ., 2012).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Farklı esansiyel yağların *E. coli* ve *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisinin değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada 8 farklı esansiyel yağın (kekik, zencefil, rezene, kimyon, kakule, mercanköşk, dereotu, fesleğen), farklı miktar ve konsantrasyonlarının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine etkileri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı elde edilen inhibisyon zonlarına ait bulgular Çizelge 4.1- 4.2 ve Şekil 4.1- 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : *E. coli*'nin gelişimi üzerine esansiyel yağların etkisi.

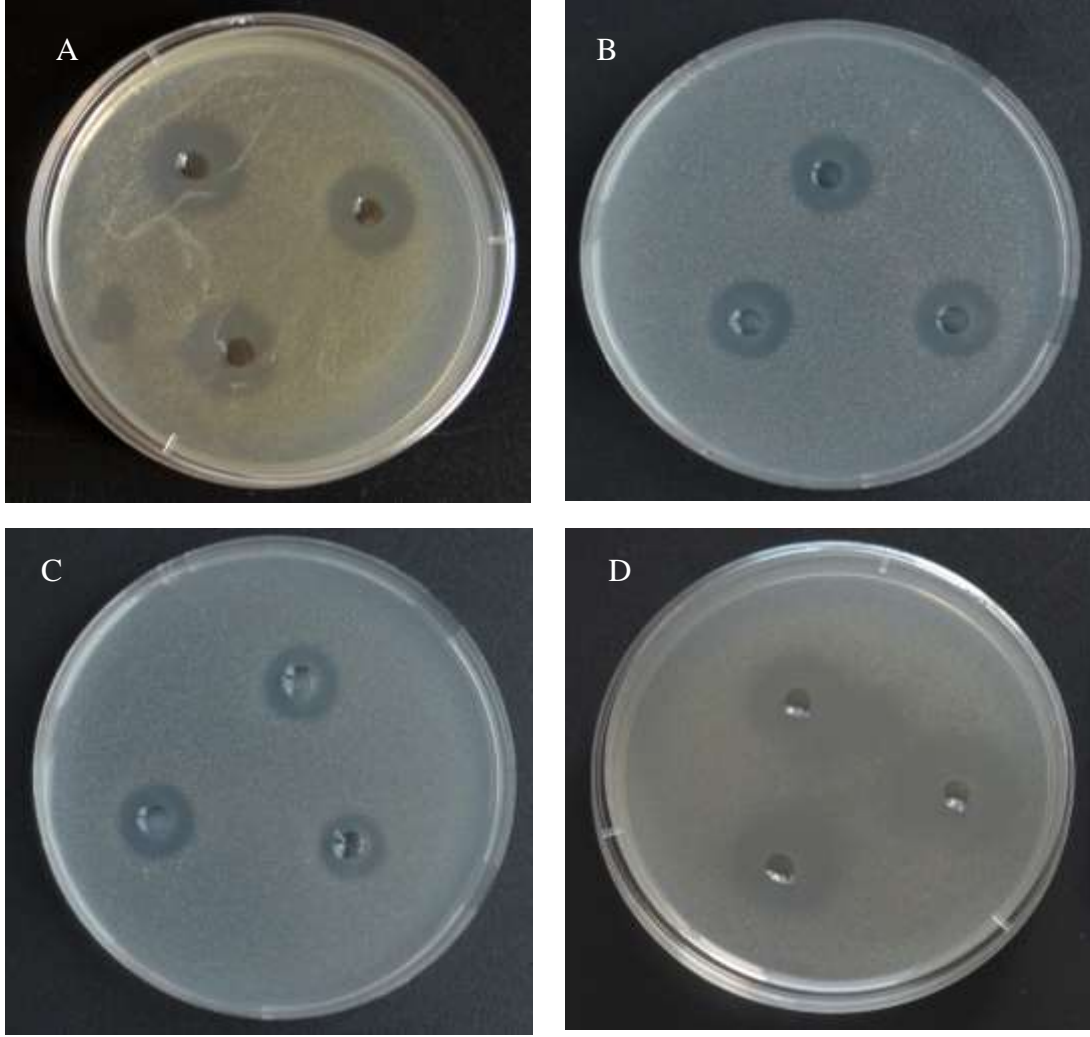
Yağ adı	İnhibisyon zonu (mm)							
	15	10	5	2,5	5	1:5	1:10	1:20
Miktar (µL)								
Seyreltme	-	-	-	-	1:5	1:10	1:20	
Dereotu	- ^a	17	12	8	EG ^b	EG	EG	
Fesleğen	EG	EG	-	-	-	-	-	
Zencefil	EG	EG	-	-	-	-	-	
Rezene	EG	EG	-	-	-	-	-	
Kimyon	-	20	15	10	EG	EG	EG	
Kakule	21	16	10	7	EG	EG	EG	
Mercanköşk	-	GG ^c	GG	GG	14	12	10	
Kekik	-	GG	GG	GG	12	9	7	

^a -: Analiz yapılmamıştır.

^b EG: Etki görülmedi.

^c GG: Gelişim görülmedi.

2,5-15 µL aralığında değişen esansiyel yağ miktarlarında fesleğen, zencefil ve rezene esansiyel yağları *E. coli*'nin gelişimi üzerine herhangi bir etki göstermezken, dereotu, kimyon, kakule, mercanköşk ve kimyon esansiyel yağları antibakteriyal etki göstermiştir. Kekik ve mercanköşk esansiyel yağı 5-10-15 µL esansiyel yağ ilavesinde bakteri gelişimini tamamen inhibe ederken, mercanköşk esansiyel yağı *E. coli*'ye karşı diğer yağlara göre en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiş, en geniş inhibisyon zonlarını oluşturmuştur.



Şekil 4.1 : Esansiyel yağların *E. coli* üzerine etkisi (A) kimyon esansiyel yağının 5 μL 'deki etki çapı, (B) dereotu esansiyel yağının 5 μL 'deki etki çapı, (C) kakule esansiyel yağının 5 μL 'deki etki çapı, (D) kimyon esansiyel yağının 10 μL 'deki etki çapı.

Antimikrobiyal etkinin daha iyi belirlenebilmesi çok aktif olarak değerlendirilen esansiyel yağlara (dereotu, kekik, kakule, kimyon, mercanköşk) 1:5, 1:10, 1:20 oranlarında seyreltme işlemi yapılmıştır. Dereotu, kimyon ve kakule esansiyel yağları bu konsantrasyonlarda *E.coli*'nin gelişimi üzerine herhangi bir etki göstermezken, kekik ve mercanköşk esansiyel yağları diğer yağlara göre gelişimi belirli miktarlarda engellemişlerdir. Mercanköşk esansiyel yağı 1:5 seyreltme oranında 14 mm, 1:10 seyreltme oranında 12 mm, 1:20 seyreltme oranında ise 10 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Kekik esansiyel yağı ise 1:5 seyreltme oranında 12 mm, 1:10 seyreltme oranında 9 mm, 1:20 seyreltme oranında ise 7 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Çizelge 4.2 : *S. aureus*'un gelişimi üzerine esansiyel yağların etkisi.

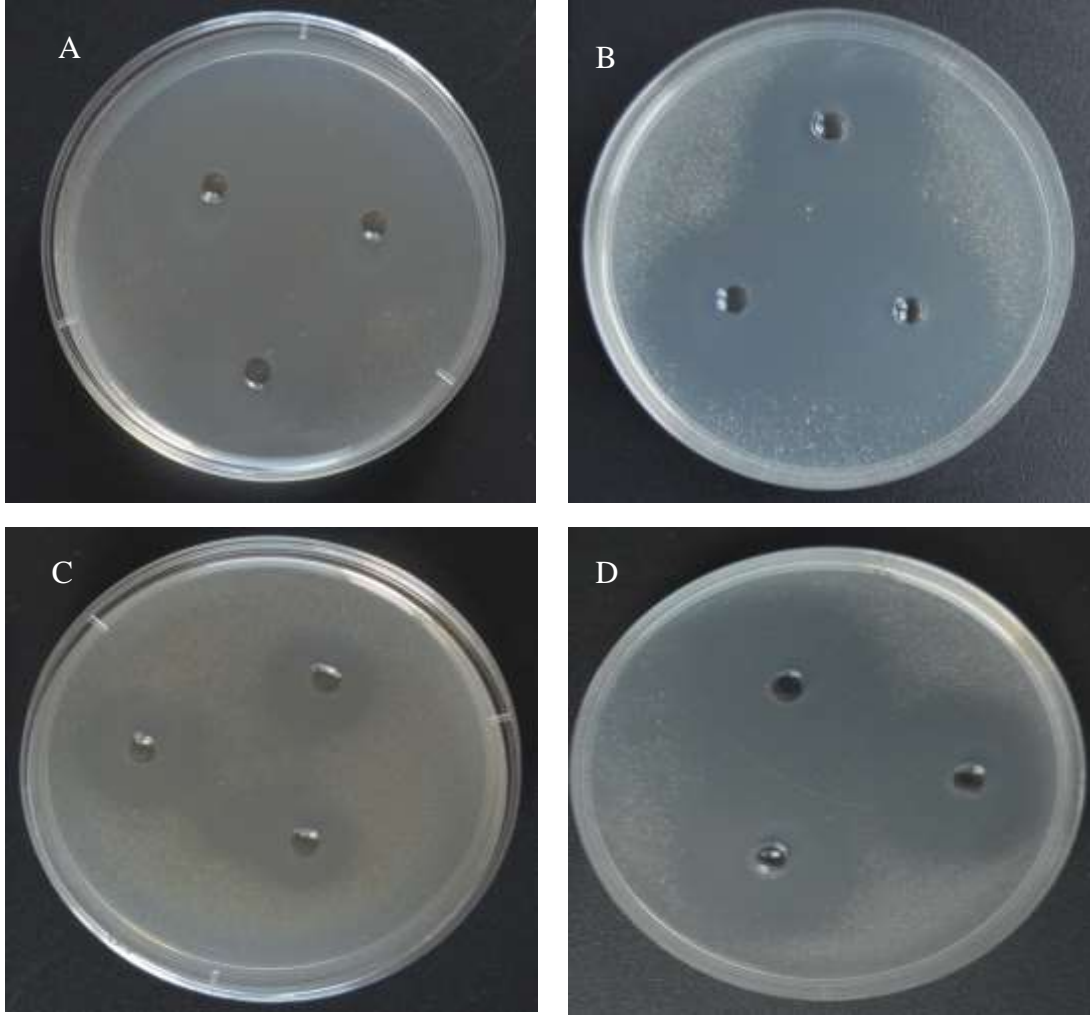
Yağ adı	İnhibisyon zonu (mm)						
	15	10	5	2,5	5		
Miktar (µL)							
Seyreltme	-	-	-	-	1:5	1:10	1:20
Dereotu	GG ^a	GG	37	25	EG	EG	EG
Fesleğen	GG	20	16	EG ^b	-	-	-
Zencefil	EG	EG	EG	-	- ^c	-	-
Rezene	EG	EG	EG	-	-	-	-
Kimyon	-	GG	GG	GG	24	EG	EG
Kakule	GG	51	40	24	10	EG	EG
Mercanköşk	GG	GG	GG	GG	40	22	11
Kekik	-	GG	GG	GG	25	14	EG

^a GG: Gelişim görülmedi.

^b EG: Etki görülmedi.

^c -: Analiz yapılmamıştır.

Zencefil ve rezene esansiyel yağları 5-10-15 µL miktarlarında *S. aureus*'a karşı herhangi bir etki göstermemişlerdir. Fesleğen esansiyel yağı 15 µL'de bakteri gelişimini tamamen inhibe ederken, 2,5 µL esansiyel yağ miktarında etki göstermemiştir. Kakule esansiyel yağı 15 µL'de, dereotu esansiyel yağı ise 15 µL ve 10 µL'de bakteri gelişimini tamamen inhibe ederken kekik, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağları 2,5 µL yağ miktarında dahi bakteri gelişimini tamamen inhibe etmiştir. Çalışmada *S. aureus*'a karşı kakule, kimyon, kekik ve mercanköşk esansiyel yağları yüksek antimikrobiyal aktivite gösterirken, en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi mercanköşk esansiyel yağı göstermiştir.



Şekil 4.2 : Esansiyel yağların *S. aureus* üzerine etkisi (A) kakule esansiyel yağının 10 µL'deki etki çapı, (B) kakule esansiyel yağının 5 µL'deki etki çapı, (C) fesleğen esansiyel yağının 10 µL'deki etki çapı, (D) dereotu esansiyel yağının 5 µL'deki etki çapı.

Antimikrobiyal etkinin daha iyi belirlenebilmesi için 2,5-15 µL aralığında değişen esansiyel yağ miktarlarında elde edilen veriler doğrultusunda aktif-orta derecede aktif-çok aktif olarak değerlendirilen esansiyel yağlara (dereotu, kekik, kakule, kimyon, mercanköşk) 1:5, 1:10, 1:20 oranlarında seyreltme işlemi yapılmıştır. Dereotu esansiyel yağı bu seyreltme oranlarında *S. aureus*'a karşı hiçbir etki göstermemiştir. Kimyon ve kakule esansiyel yağları 1:5 seyreltme oranında sırasıyla 24 mm ve 10 mm inhibisyon zonu oluştururken, 1:10 ve 1:20 seyreltme oranlarında herhangi bir etki göstermemişlerdir. Kekik esansiyel yağı ise yağı 1:5 seyreltme oranında 25 mm, 1:10 seyreltme oranında 14 mm inhibisyon zonu oluşturmuş, 1:20 seyreltme oranında ise herhangi bir etki göstermemiştir. *S. aureus*'a karşı en aktif esansiyel yağ mercanköşk bulunmuştur. Mercanköşk esansiyel yağı 1:5 seyreltme

oranında 40 mm, 1:10 seyreltme oranında 22 mm, 1:20 seyreltme oranında ise 11 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmada zencefil esansiyel yağının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi belirlenmemiştir. Benzer olarak disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilen bir çalışmada zencefilin (*Zingiber officinale* Roscoe) etanolik ekstraktının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinliğinin olmadığı bulunmuştur (Onyeagba ve diğ., 2004). Diğer bir çalışmada da Alzoreky ve Nakahara (2003), disk difüzyon yöntemiyle zencefil esansiyel yağının *E. coli* üzerine etkili olmadığını belirlemişlerdir. Bununla birlikte zencefil esansiyel yağının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada disk difüzyon yöntemi uygulanmış, 6 mm çapındaki disklere 3 µL yağ ilavesinde sırasıyla 40 mm ve 30 mm inhibisyon zonu elde edilmiştir (Bellik, 2014).

Yaz döneminde elde edilen fesleğen (*Ocimum basilicum*) esansiyel yağının disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada 15 µL fesleğen esansiyel yağının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Hussain ve diğ., 2008). Prabuseenivasan ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada da 50 µL fesleğen esansiyel yağının 1:1 ve 1:5 oranında seyreltilen konsantrasyonlarının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Fakat azalan konsantrasyonlarda (1:10, 1:20) bu bakteriler üzerine antimikrobiyal etki belirlememişlerdir. Bu çalışmada ise fesleğen esansiyel yağının *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkisi belirlenmezken, *S. aureus*'a karşı çalışılan tüm miktarlarda antimikrobiyal etki belirlenmiştir.

Bu çalışmada rezene esansiyel yağının da *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisi belirlenmemiştir. Benzer şekilde bazı bitki özütlerinin *Staphylococcus epidermis* ve *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* türleri üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin agar kuyucuk difüzyon metoduyla araştırıldığı çalışmada rezene yağının antimikrobiyal etkisine rastlanılmamıştır (Schelz ve diğ., 2006). Fakat *Foeniculum vulgare* tohumlarından elde edilen rezene esansiyel yağının antimikrobiyal etkinliğinin disk difüzyon yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı inhibisyon zonları elde edilmiştir (Diao ve diğ., 2014). Kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilediği düşünülmektedir.

Origanum minutiflorum bitkisinden elde edilen mercanköşk esansiyel yağlarının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 1:1, 1:5, 1:10 oranlarında seyreltilen yağ konsantrasyonlarının mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon çapları oluşturduğu belirlenmiştir (Şarer ve diğ., 1996). Elde edilen zon çapları Çizelge 2.4'te verilmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde, çalışılan tüm yağ konsantrasyonlarında inhibisyon çapları elde edilmiştir. Mercanköşk esansiyel yağının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Antimikrobiyal etkinliğin araştırıldığı çalışmalarda Teixeira ve diğ. (2013) kekik esansiyel yağının *E. coli*'ye karşı, Fadli ve diğ. (2012) ise *Thymus maroccanus* ve *Thymus broussonetii* bitkilerinden elde edilen kekik esansiyel yağının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada kekik türleri olan *Thymus eriocalyx* ve *Thymus xporlock*'tan ekstrakte edilen esansiyel yağların *Listeria monocytogenes*'e karşı etkisi disk ve tüp dilüsyon metodu ile araştırılmıştır. Esansiyel yağlar en yüksek antimikrobiyal etkiyi 250 ppm'de göstermiştir. Antimikrobiyal etkinlik sitoplazmada azalma, hücre duvarında bozulma ve hücre içi materyallerde topaklanma şeklinde ortaya çıkmaktadır (Rasooli ve diğ., 2006). Bu çalışmada ise elde edilen bulgular yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Kekik esansiyel yağının çalışılan tüm miktar ve konsantrasyonlarında *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Kimyon, tarçın ve karanfil esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı disk difüzyon yönteminde 10-30 mm arasında inhibisyon zonu elde edilmiştir (Agaoglu ve diğ., 2007). Yapılan başka bir çalışmada adaçayı, biberiye, çörekotu, kimyon, karanfil, kekik ve bunların temel bileşenlerinin inhibitör etkileri analiz edilmiştir. Çalışmada çeşitli uçucu yağların 0.25-12 mg/mL oranlarında dahi mikrobiyal gelişimi önlediği, uçucu yağların ve temel bileşenlerinin gram-negatif bakteriler üzerine, gram-pozitif bakterilere oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada en etkili yağların kekik ve kimyon yağları olduğu belirlenmiştir (Farang ve diğ., 1989). Diğer bir çalışmada da kimyon (*Cuminum cyminum* L.) tohumlarından elde edilen esansiyel yağın *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde inhibisyon zonları oluşturduğu belirlenmiştir. (Haşimi ve diğ., 2014). Bu çalışmada da elde edilen sonuçlar benzer şekildedir.

Helicobacter pylori bakterisine karşı dereotu ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyon yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada DMSO ile ekstraktın farklı

konsantrasyonları (10, 20, 40, 80, 250 ve 500 mg/mL) hazırlanmış, disklere 30 µL ekstrakt eklenmiştir. 500 mg/mL konsantrasyonda 9-12 mm, 250 mg/mL konsantrasyonda 8-10 mm, inhibisyon zonu elde edilirken azalan ekstrakt konsantrasyonlarında bakteri gelişimi belirlenmiştir (Sadeghian ve diğ., 2005). Bu çalışmada da elde edilen inhibisyon çapları eklenen yağ konsantrasyonlarının azalmasıyla doğru orantılı olarak azalmıştır. Dovgich (1971) dereotu (*Anethum graveolens* L.) esansiyel yağının 1:320 konsantrasyonda *Bacillus subtilis*'i, 1:160 konsantrasyonda *S. aureus*'u inhibe ettiğini fakat *E. coli*'nin gelişimini engellemediğini rapor etmiştir. Farklı mikroorganizmalar aynı konsantrasyondaki, aynı esansiyel yağa farklı direnç göstermişlerdir. Başka bir çalışmada dereotu ekstraktlarının ve dereotu esansiyel yağının *S. aureus*, *E. coli* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etkisi agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Dereotu ekstraktlarının (100 µL) antimikrobiyal etkisine rastlanılmazken, dereotu esansiyel yağının (100 µL) *E. coli* ve *S. aureus*'u tamamen inhibe ettiği, *C. albicans*'ın ise 18-20 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir (Rasheed ve diğ., 2010).

Kakule tohumunun (*Elettaria cardamomum* Maton) bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada kakule tohumunun dietil eterde hazırlanmış ekstraktı *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium*, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans* üzerine disk difüzyon metodu kullanılarak in vitro olarak denenmiştir. Sonuç olarak; kakule tohumundan elde edilen ekstraktın, test suşlarından *M. smegmatis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus* ve *C. albicans* üzerine farklı düzeylerde inhibitör aktivite gösterdiği, ancak *P. aeruginosa* üzerine antimikrobiyal etkinin olmadığı tespit edilmiştir. Kakuleye karşı en hassas suşun *S. aureus* (30 mm inhibisyon zonu) olduğu belirlenirken, en zayıf inhibitör etki *E. coli*'de (13 mm inhibisyon zonu) gözlenmiştir (Agaglu ve diğ., 2005). Bu çalışmada da benzer şekilde *S. aureus*'un *E. coli*'ye göre kakule esansiyel yağına karşı daha hassas olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* üzerinde daha geniş inhibisyon çapları elde edilmiştir. Aneja ve Sharma (2010) kakule bitkisinin (*Elettaria cardamomum*) meyvelerinden farklı çözümler kullanarak elde edilen ekstraktlara karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. aureus*'un aseton ekstraktlarında gözlemlerken, en düşük aktiviteyi *E.*

coli'nin metanolik ekstraktlarında gözlemlemişlerdir. Farklı çözümlerle elde edilen ekstraktların farklı antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

4.2 Farklı Esansiyel Yağların *E. coli* ve *S. aureus* Gelişimine Etkisi

Djabou ve diğ. (2013)'nin inhibisyon çaplarına bağlı olarak esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerinin sınıflandırması dikkate alınarak, agar kuyucuk difüzyon yöntemi sonucunda elde edilen inhibisyon çapları değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmı için genel olarak *E. coli* ve/veya *S. aureus*'a karşı yüksek aktivite gösteren esansiyel yağlar seçilmiş ve bu yağların *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin inkübasyon süresince değişimi izlenmiş ayrıca MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir.

Agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilen bulgular doğrultusunda çalışılan konsantrasyonlarda *E. coli*'ye karşı fesleğen, zencefil ve rezene esansiyel yağları, *S. aureus*'a karşı ise zencefil ve rezene esansiyel yağları antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. Kekik ve mercanköşk esansiyel yağları diğer yağlara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterirken, her iki mikroorganizmaya karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi mercanköşk esansiyel yağı göstermiştir.

E. coli'ye karşı çok aktif (kekik, mercanköşk), orta derecede aktif (kakule, kimyon) esansiyel yağları, *S. aureus*'a karşı ise çok aktif (kekik, mercanköşk, kakule, kimyon) esansiyel yağlar seçilmiştir. Dereotu ve kakule esansiyel yağlarında elde edilen inhibisyon çapları benzer olmasına rağmen kakule esansiyel yağı ile ilgili daha az literatür çalışmasına rastlanılması sebebiyle bu yağ tercih edilmiştir.

Çizelge 4.3 : Esansiyel yağların *E. coli* ve *S. aureus* üzerine aktiflik değerlendirmesi.

	Kekik	Kakule	Zencefil	Mercanköşk	Dereotu	Rezene	Kimyon	Fesleğen
<i>E. coli</i>	+++ ^a	+	-	+++	+ ^b	-	+	-
<i>S. aureus</i>	+++	+++	- ^c	+++	+++	-	+++	+

^a Çok aktif.

^b Orta derecede aktif.

^c Aktif değil.

Yapılan çalışmada seçilen esansiyel yağların 8 farklı konsantrasyonunun (30; 15; 7,5; 3,75; 1,87; 0,93; 0,46; 0,23) *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin gelişimi üzerine etkisi mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kakule, kimyon, kekik ve mercanköşk

esansiyel yağlarının etkisi, mikro plak okuyucuda 600 nm’de, 0.; 2.; 4.; 6.; 8.; 10.; 12.; 18.; 20.; 22.; 24. inkübasyon süresi sonunda optik yoğunluk ölçülerek belirlenmiştir. Mikroorganizmaların optik yoğunluğuna ve bulanıklığın değerlendirilmesine göre belirlenen MİK ve MBK değerleri Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’te verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Kekik, kakule, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağlarının optik yoğunluk ölçümüyle belirlenen MİK ve MBK değerleri.

	MİK (µL/mL)				MBK (µL/mL)			
	Kekik	Kimyon	Kakule	Mercanköşk	Kekik	Kimyon	Kakule	Mercanköşk
<i>E. coli</i>	0,93	7,5	7,5	0,93	0,93	7,5	7,5	0,93
<i>S.aureus</i>	3,75	15	30	1,87	3,75	15	30	1,87

Çizelge 4.5 : Kekik, kakule, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağlarının bulanıklığın değerlendirilmesiyle belirlenen MİK ve MBK değerleri.

	MİK (µL/mL)				MBK (µL/mL)			
	Kekik	Kimyon	Kakule	Mercanköşk	Kekik	Kimyon	Kakule	Mercanköşk
<i>E. coli</i>	0,93	3,75	3,75	0,46	0,93	7,5	7,5	0,93
<i>S.aureus</i>	3,75	7,5	15	0,93	3,75	15	30	1,87

Bulanıklık tayini ve optik yoğunluk tayini ile *E. coli* ve *S. aureus* için belirlenen MİK değerleri kakule, kimyon ve mercanköşk esansiyel yağlarında farklılık göstermiştir. Optik yoğunluk ölçümüyle belirlenen MİK değerleri *E. coli* için kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 7,5 µL/mL, mercanköşk esansiyel yağında 0,93 µL/mL iken; *S. aureus*’un gelişimini engelleyen minimum esansiyel yağ konsantrasyonları ise kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla 15 µL/mL, 30 µL/mL, 1,87 µL/mL’dir. Bulanıklık tayiniyle belirlenen MİK değerleri, optik yoğunluğa göre belirlenen değerlerden daha yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Bulanıklık tayiniyle belirlenen MİK değerleri *E. coli* için kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 3,75 µL/mL, kekikte 0,93 µL/mL, mercanköşkte 0,46 µL/mL; *S. aureus* için ise kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla 3,75 µL/mL, 7,5 µL/mL, 15 µL/mL, 0,93 µL/mL’dir. Kekik esansiyel yağında ise her iki yöntemle de belirlenen MİK değeri aynıdır ve *E. coli* için 0,93 µL/mL, *S. aureus* için 3,75 µL/mL’dir. Souza ve diğ. (2007) esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğinin belirlendiği birçok çalışmada aynı esansiyel yağın farklı yöntemlerle farklı MİK değerlerinin elde edilebildiğini bildirmişlerdir.

Viljoen ve diğ. (2003)'ne göre; antimikrobiyal etkinliğin belirlenmesinde mikroplak okuyucuyla yapılan analizler daha hassas sonuçlar verdiği için diğer analizlerden daha farklı MİK değerleri elde edilebilmektedir.

Petri kutularına ekim sonucu belirlenen MBK değerleri ile mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen MBK değerlerinin çalışılan tüm yağlarda aynı olduğu belirlenmiştir. Belirlenen MBK değerleri *E. coli* için kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarında 0,93 µL/mL, kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 7,5 µL/mL; *S. aureus* için ise kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla 3,75 µL/mL, 15 µL/mL, 30 µL/mL, 1,87 µL/mL belirlenmiştir.

S. aureus'a karşı en düşük MİK ve MBK değeri mercanköşk esansiyel yağında belirlenirken, *E. coli*'ye karşı en düşük MİK ve MBK değeri mercanköşk ve kekik esansiyel yağlarında belirlenmiştir. Kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarının çok düşük konsantrasyonları bile bakterilerin gelişimini tamamen engelleyebilmiştir. Antimikrobiyal etkinliği en düşük olan esansiyel yağ *E. coli* için kakule ve kimyon, *S. aureus* için ise kakule esansiyel yağı olarak belirlenmiştir. Kakule, kimyon, kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarının her birinde *S. aureus* için belirlenen MİK ve MBK değerleri, *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu için *S. aureus*'un *E. coli*'ye göre bu yağlara karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

Esansiyel yağların bulanıklık tayini ile belirlenen MİK ve MBK değerleri genellikle farklıdır fakat mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen MİK ve MBK değerleri her yağ için aynı tespit edilmiştir. Optik yoğunluk tayininin, bulanıklık tayinine göre çok daha hassas olması sebebiyle optik yoğunluğa göre belirlenen sonuçlar dikkate alınmıştır. Yavuz (2014), kakule ve kekik esansiyel yağlarının *Aspergillus carbonarius* izolatlarına antifungal etkisini disk difüzyon yöntemiyle araştırdığı çalışmada da benzer şekilde MİK ve MBK değerlerini aynı tespit etmiştir. Bouzidi ve diğ. (2013) de makrodilüsyon yöntemiyle farklı kekik türlerinin antimikrobiyal etkinliğini araştırdıkları çalışmada MİK ve MBK değerlerini aynı konsantrasyonda belirlemişlerdir.

4.2.1 Esansiyel yağ konsantrasyonunun *E. coli* gelişimine etkisi

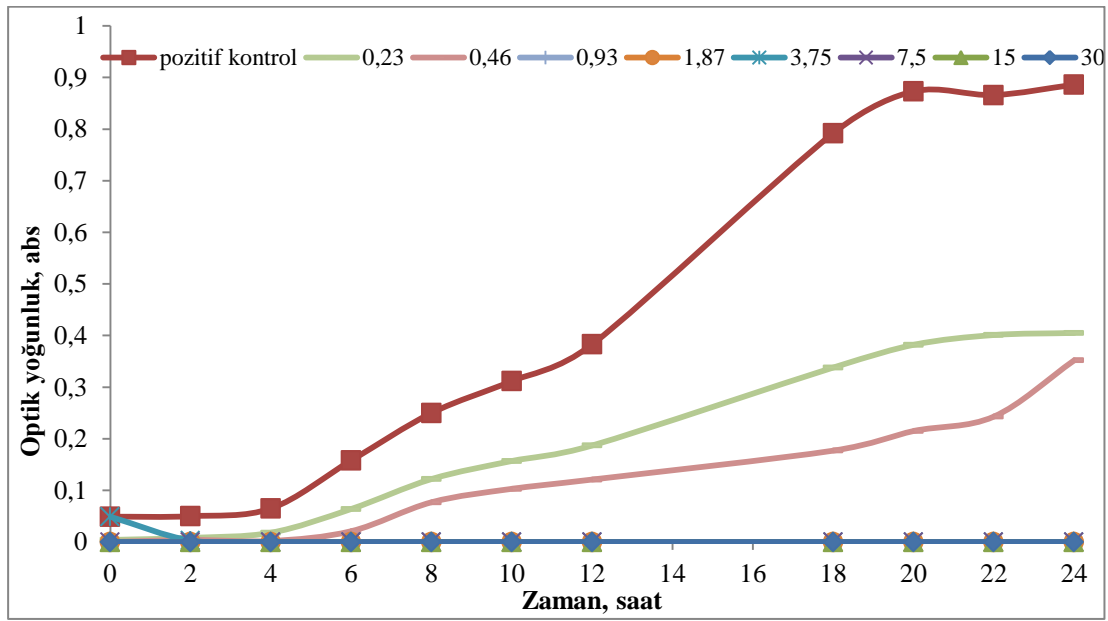
4.2.1.1 Kekik

Farklı konsantrasyonlarda kekik esansiyel yağının sıvı besiyerine ilavesi ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. 0,93-30 µL/mL aralığındaki esansiyel yağ konsantrasyonunun 2 saatlik inkübasyon süresinden itibaren mikroorganizmaların gelişimini önlediği tespit edilmiştir. Azalan yağ konsantrasyonlarında ise 24 saat sonundaki *E. coli* gelişiminin, kuyucuklardaki yağ konsantrasyonu azaldıkça arttığı belirlenmiştir. 24 saat sonunda kekik esansiyel yağının 0,93-30 µL/mL konsantrasyon aralığında bakteri gelişimini tamamen engellediği belirlenmiştir. 0,23 µL/mL ve 0,46 µL/mL yağ konsantrasyonlarında ise 4. saatten sonra bakterilerin optik yoğunluğunda artış tespit edilmiştir fakat 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda belirlenen değerlerin pozitif kontrolün optik yoğunluğundan düşük olduğu tespit edilmiştir. 0,23 µL/mL konsantrasyondaki kekik esansiyel yağının yaklaşık olarak %54 oranında, 0,46 µL/mL konsantrasyonunun ise %60 oranında bakteri gelişimini engellediği belirlenmiştir.

Bulanıklık tayiniyle elde edilen bulgular, optik yoğunluk tayiniyle elde edilen bulgularla benzerlik göstermiştir. 0,93-30 µL/mL aralığındaki esansiyel yağ konsantrasyonu bulunan kuyucuklarda bulanıklık gözlenmezken, 0,46 ve 0,23 µL/mL yağ konsantrasyonunun bulunduğu kuyucuklarda bulanıklık gözlenmiştir. Petri kutularına ekim sonucu, esansiyel yağ konsantrasyonu 0,93-30 µL/mL aralığında olan petri kutularında bakteri gelişimi gözlenmezken azalan konsantrasyonlarda yoğun şekilde gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *E. coli*'nin gelişimini önleyen ve *E. coli*'yi öldüren minimum konsantrasyon optik yoğunluk tayiniyle elde edilenlerle aynıdır ve 0,93 µL/mL (803,5 µg/mL) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6 : Farklı konsantrasyonlardaki kekik esansiyel yağının etkisiyle *E. coli*'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu ($\mu\text{L}/\text{mL}$)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,049	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,050	0,008	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,065	0,018	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,158	0,064	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,250	0,122	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,312	0,157	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,383	0,187	0,121	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,792	0,338	0,177	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,873	0,382	0,215	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
22	0,866	0,401	0,243	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	0,886	0,405	0,352	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000



Şekil 4.3 : Kekik esansiyel yağı varlığında *E. coli*'nin gelişimi.

Teixeria ve diğ. (2013), kekik esansiyel yağının *E. coli*'nin gelişmesini önleyen minimum yağ konsantrasyonunu 2,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise mikrodilüsyon yöntemiyle *Thymus algerinsis* bitkisinden elde edilen kekik esansiyel yağının *E. coli* için MİK değeri 0,002 mg/mL , MBK değeri ise 0,004 mg/mL olarak belirlenmiştir (Giweli ve diğ., 2013). Fakat kekik esansiyel yağının antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda *E. coli* bakterisine karşı, MİK değerleri genellikle 0,45-1,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyon aralığında belirlenmiştir (Faray ve diğ., 1989; Smith-Palmer ve diğ., 1998). Yapılan çalışmada da belirlenen MİK değeri bu aralıktadır. Bir diğer çalışmada Bouzidi ve diğ. (2013), bazı kültür ve yabancı kekik türlerinin antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır. Makrodilüsyon yönteminin kullanıldığı çalışmada *E. coli*'ye karşı elde edilen MİK ve MBK

değerleri, bu çalışmada olduğu gibi aynıdır. Kültür ve yabani *Thymus broussonetii* için sırasıyla 0,91 mg/mL, 0,9 mg/mL, kültür ve yabani *Thymus maroccanus* için sırasıyla 0,96 mg/mL, 0,46 mg/mL, kültür ve yabani *Thymus satureioides* için 1,8 mg/mL, 1,78 mg/mL olarak belirlemişlerdir. Farklı kekik türleri farklı antimikrobiyal aktivite göstermiştir fakat belirlenen MİK değerleri bu çalışmada belirlenen MİK değeri ile benzerlik göstermektedir.

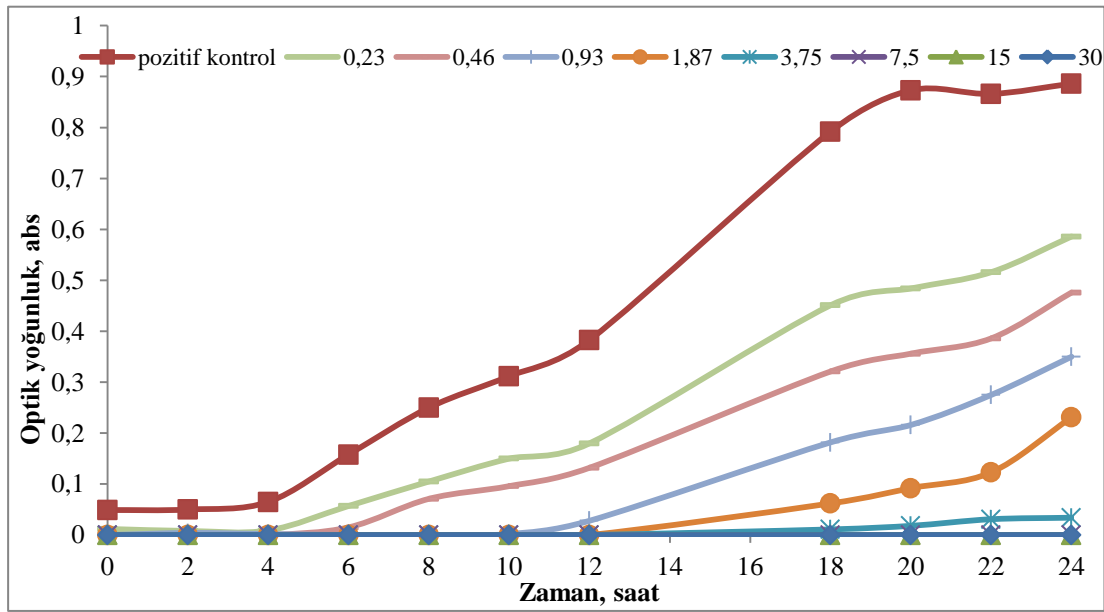
4.2.1.2 Kimyon

Kimyon esansiyel yağının mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.7 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. 24 saat sonunda 7,5-30 µL/mL konsantrasyon aralığında kimyon esansiyel yağı *E. coli*'yi tamamen inhibe etmiştir. Azalan konsantrasyonlarda ise mikroorganizmaların optik yoğunluğunun, yağ konsantrasyonu azaldıkça arttığı gözlemlenmiştir. Ölçüm yapılan inkübasyon süreleri sonunda mikroorganizmaların optik yoğunluğu, pozitif kontrolün optik yoğunluğundan daha düşük olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla 7,5; 15; 30 µL/mL yağ konsantrasyonlarında bakteri gelişimi tamamen inhibe edilmiş olsa da çalışılan diğer yağ konsantrasyonlarının da mikroorganizma gelişimini belirli miktarlarda engellediği tespit edilmiştir. Kimyon esansiyel yağı *E. coli* gelişimini 0,23 µL/mL konsantrasyonda %34, 0,46 µL/mL konsantrasyonda %46, 0,93 µL/mL konsantrasyonda %61, 1,87 µL/mL konsantrasyonda %74 oranında engellerken, 3,75 µL/mL konsantrasyonda %96 oranında engellemiştir.

96 kuyucuklu plaklarda inkübasyon sonucunda yağ konsantrasyonu 0,23-1,87 µL/mL aralığında olan kuyucuklarda çok yoğun bulanıklık gözlemlenirken, 3,75 µL/mL ve artan konsantrasyonlarda bulanıklık gözlenmemiştir. Bulanıklık tayinine göre MİK değeri 3,75 µL/mL, *E. coli*'nin optik yoğunluğuna göre MİK değeri 7,5 µL/mL belirlenmiştir. Petri kutularına ekim sonucu bakteri yoğunluğu 0,23-3,75 µL/mL aralığında olan petri kutularında konsantrasyon artışıyla ters orantılı olarak azalırken, 7,5 µL/mL ve artan konsantrasyonlarda ise bakteri gelişimi gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen MBK değeri, optik yoğunluğa göre belirlenen MBK değerini doğrular niteliktedir ve 7,5 µL/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7 : Farklı konsantrasyonlardaki kimyon esansiyel yağının etkisiyle *E. coli*'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu ($\mu\text{L}/\text{mL}$)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,049	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,050	0,008	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,065	0,009	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,158	0,057	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,250	0,105	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,312	0,150	0,096	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,383	0,180	0,132	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,792	0,451	0,321	0,182	0,062	0,011	0,000	0,000	0,000
20	0,873	0,484	0,356	0,216	0,092	0,018	0,000	0,000	0,000
22	0,866	0,516	0,386	0,275	0,123	0,031	0,000	0,000	0,000
24	0,886	0,586	0,476	0,350	0,231	0,034	0,000	0,000	0,000



Şekil 4.4 : Kimyon esansiyel yağı varlığında *E. coli* 'nin gelişimi.

Bu çalışmada *E. coli* için kimyon esansiyel yağının MİK değeri $7,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ ($6967,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) olarak belirlenmişken, siyah kimyon çekirdeklerinin etanol ve kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğinin makrodilüsyon yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada *E. coli* için MİK değeri $3000 \mu\text{g}/\text{mL}$ tespit edilmiştir (Alam ve diğ., 2010). Kimyon ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin makrodilüsyon yöntemiyle araştırıldığı başka bir çalışmada ise *E. coli*'nin gelişimini engelleyen minimum konsantrasyon $12,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir (Karankı, 2013). Esansiyel yağların elde edildiği bitkilerin hasat zamanı, yağın elde edilme yöntemi, antimikrobiyal analizde kullanılan çözenler, yöntem farklılığı gibi etmenler tespit edilen sonuçlarda farklılıklara sebep olabilmektedir.

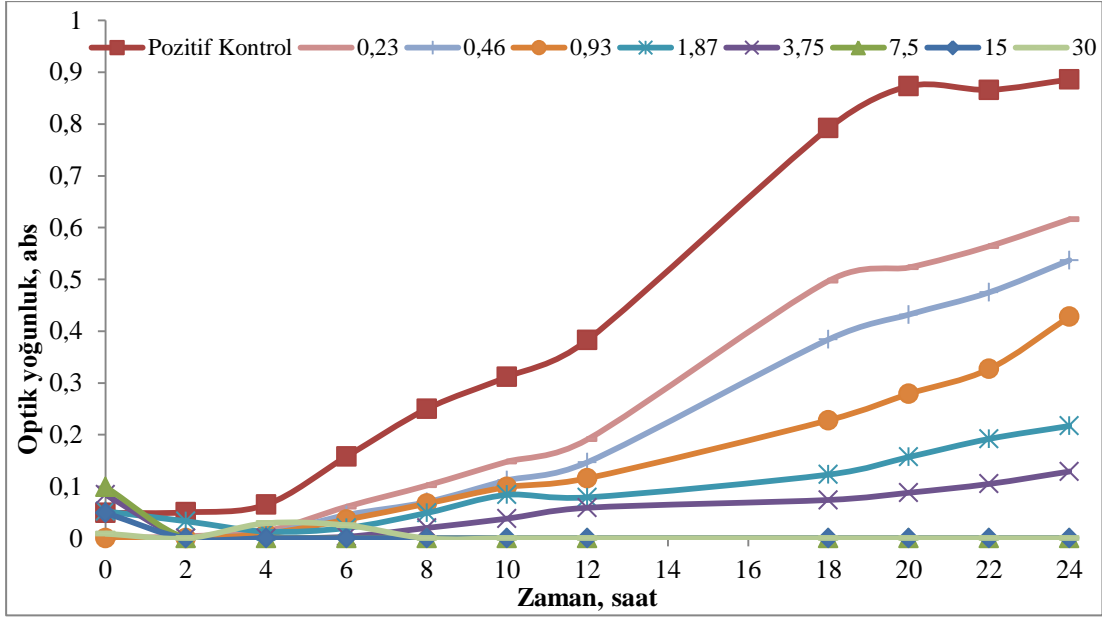
4.2.1.3 Kakule

Kakule esansiyel yağı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.8 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. 7,5-15-30 µL/mL esansiyel yağ konsantrasyonlarında *E. coli*'nin tamamen inhibe edildiği, 3,75 µL/mL ve azalan yağ konsantrasyonlarında ise bakterilerin optik yoğunluğunun giderek arttığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin 2. saatinin sonunda genellikle bütün yağ konsantrasyonlarının, mikroorganizmaların optik yoğunluğunu azalttığı belirlenmiştir. 2. saatten sonra ise 0,23-3,75 µL/mL aralığındaki yağ konsantrasyonlarında bakterilerin optik yoğunluğu inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak artmıştır. 24 saatin sonunda pozitif kontrolün optik yoğunluğu ile karşılaştırma yapılarak bütün yağ konsantrasyonlarının *E. coli* gelişimini belirli oranlarda engellediği tespit edilmiştir. 0,23 µL/mL konsantrasyonda %31, 0,46 µL/mL konsantrasyonda %39, 0,93 µL/mL konsantrasyonda %52, 1,87 µL/mL konsantrasyonda %76 oranında engellerken, 3,75 µL/mL konsantrasyonda %85 oranında mikroorganizma gelişimini engellediği belirlenmiştir.

Broth dilüsyon yöntemiyle görsel olarak bulanıklığın gözlenmediği en düşük yağ konsantrasyonu 3,75 µL/mL iken, petri kutularına ekim sonucu mikroorganizma gelişiminin gözlenmediği en düşük yağ konsantrasyonu 7,5 µL/mL olarak belirlenmiştir. Mikro plak okuyucu ile elde edilen bulgular, belirlenen MBK değerini doğrulamıştır ancak MİK değerinin de 7,5 µL/mL olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.8 : Farklı konsantrasyonlardaki kakule esansiyel yağının etkisiyle *E. coli*'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu (µL/mL)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,049	0,000	0,000	0,000	0,052	0,084	0,099	0,049	0,009
2	0,050	0,004	0,002	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,065	0,014	0,009	0,009	0,013	0,000	0,000	0,000	0,029
6	0,158	0,061	0,045	0,036	0,020	0,003	0,000	0,000	0,025
8	0,250	0,102	0,070	0,067	0,049	0,020	0,000	0,000	0,000
10	0,312	0,148	0,112	0,099	0,084	0,038	0,000	0,000	0,000
12	0,383	0,191	0,147	0,116	0,079	0,059	0,000	0,000	0,000
18	0,792	0,497	0,384	0,228	0,123	0,074	0,000	0,000	0,000
20	0,873	0,523	0,432	0,279	0,157	0,088	0,000	0,000	0,000
22	0,866	0,564	0,475	0,327	0,192	0,105	0,000	0,000	0,000
24	0,886	0,616	0,537	0,428	0,217	0,129	0,000	0,000	0,000



Şekil 4.5 : Kakule esansiyel yağı varlığında *E. coli* 'nin gelişimi.

Gerçekleştirilen çalışmada *E. coli*'yi inhibe etmek için gerekli olan minimum konsantrasyon 6,74 mg/mL (7,5 µL/mL) belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada ise kakule (*Elettaria cardamomum*) bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstraktın antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır ve *E. coli* bakterisine karşı elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonu 50 mg/mL belirlenmiştir (Aneja ve Sharma, 2010). Bu değer bu çalışmada belirlenen konsantrasyondan oldukça yüksektir.

4.2.1.4 Mercanköşk

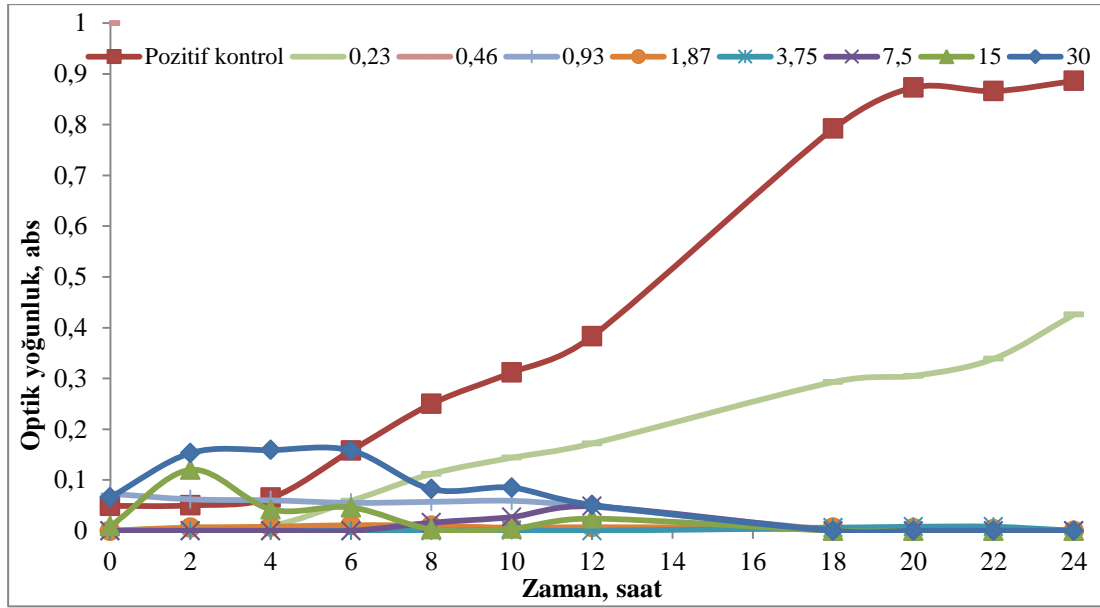
Mercanköşk esansiyel yağı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.9 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. 0,93-30 µL/mL aralığındaki esansiyel yağ konsantrasyonları *E. coli* gelişimini tamamen inhibe etmiştir. 0,46 µL/mL yağ konsantrasyonunun bulunduğu kuyucukta 18. saatte mikroorganizmaların optik yoğunluğunda artış olmuştur fakat 20. saatten sonra herhangi bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. İnkübasyon süresince 0,23 µL/mL esansiyel yağ konsantrasyonunun bulunduğu kuyucuktaki mikroorganizmaların optik yoğunluğunda sürekli artış gözlenmiştir. Fakat 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda çalışılan bütün esansiyel yağ konsantrasyonlarının bakteri gelişimini farklı oranlarda engellediği belirlenmiştir. 24 saat sonunda elde edilen optik yoğunlukların pozitif kontrolün optik yoğunluğundan az olduğu tespit edilmiştir. Mercanköşk esansiyel yağının 0,46-0,93 µL/mL aralığındaki konsantrasyonları mikroorganizma gelişimini tamamen inhibe ederken,

0,23 µL/mL konsantrasyonunun %52 oranında, 0,46 µL/mL konsantrasyonunun ise %94 oranında mikroorganizma gelişimini engellediği belirlenmiştir.

Çalışılan 0,23-30 µL/mL esansiyel yağ konsantrasyonu aralığında sadece 0,23 µL/mL konsantrasyonda bulanıklık gözlemlenmiştir. Bu yöntemle belirlenen MİK değeri ile mikroorganizmaların optik yoğunluğu ile belirlenen MİK değerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Optik yoğunluk tayini daha hassas bir yöntem olduğu için bu yöntemle elde edilen MİK değeri doğru kabul edilmiş ve 0,93 µL/mL olarak belirlenmiştir. Petri kutularına ekim sonucunda 0,93 µL/mL ve artan konsantrasyonlarda bakteri gelişimi gözlenmezken, 0,46 µL/mL konsantrasyonda çok az, 0,23 µL/mL konsantrasyonda ise çok yoğun bakteri gelişimi gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen MBK değeri, mikroorganizmaların optik yoğunluğu ile belirlenen MBK değeri ile benzerlik göstermiş ve 0,93 µL/mL olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9 : Farklı konsantrasyonlardaki mercanköşk esansiyel yağının etkisiyle *E. coli*'nin optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu (µL/mL)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,049	0,000	0,000	0,073	0,000	0,000	0,000	0,009	0,066
2	0,050	0,007	0,000	0,062	0,006	0,000	0,000	0,120	0,153
4	0,065	0,010	0,000	0,060	0,008	0,000	0,000	0,042	0,159
6	0,158	0,059	0,000	0,055	0,011	0,000	0,000	0,046	0,158
8	0,250	0,112	0,000	0,057	0,010	0,000	0,016	0,003	0,082
10	0,312	0,144	0,000	0,059	0,006	0,001	0,027	0,004	0,085
12	0,383	0,172	0,001	0,048	0,007	0,000	0,048	0,024	0,051
18	0,792	0,293	0,049	0,002	0,006	0,006	0,000	0,000	0,000
20	0,873	0,305	0,051	0,001	0,005	0,008	0,000	0,000	0,000
22	0,866	0,339	0,051	0,003	0,003	0,008	0,000	0,000	0,000
24	0,886	0,426	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000



Şekil 4.6 : Mercanköşk esansiyel yağı varlığında *E. coli* 'nin gelişimi.

Özkalp ve diğ. (2010), mercanköşk (*Origanum vulgare* L.) esansiyel yağının antimikrobiyal özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada mikrodilüsyon yöntemini kullanmışlardır. 96 kuyucuklu plaklarda 500-0,5 µg/mL aralığında seyreltilen esansiyel yağın *E. coli*'nin gelişimini engelleyen minimum konsantrasyonunu 250 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Teixeira ve diğ. (2013) ise mercanköşk esansiyel yağının *E. coli*'nin gelişmesini önleyen minimum yağ konsantrasyonunu 2,7 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Bu iki çalışmada belirlenen değerler yapılan çalışmada belirlenen değerlerden düşüktür. Fakat mercanköşk esansiyel yağının *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı çalışmalarda MİK değeri genellikle 0,5-1,2 µL/mL konsantrasyon aralığında tespit edilmiştir (Prudent ve diğ., 1995; Hammer ve diğ., 1999). Bu çalışmada belirlenen MİK değeri 0,93 µL/mL (874,2 µg/mL)'dir ve birçok çalışmayla belirlenen bu konsantrasyon aralığında yer almaktadır. Benzer şekilde mikrodilüsyon yöntemiyle mercanköşk esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı başka bir çalışmada *E. coli*'nin inhibisyonu için gerekli olan minimum yağ konsantrasyonu 0,625 µL/mL olarak belirlenmiştir (Witkowska ve diğ., 2014). Yapılan başka bir çalışmada da mercanköşk esansiyel yağının *E. coli* için MİK değeri 0,625 µL/mL olarak belirlenmiştir ve bu değer de bu konsantrasyon aralığı içerisindedir (Lv ve diğ., 2011).

4.2.2 Esansiyel yağ konsantrasyonunun *S. aureus* gelişimine etkisi

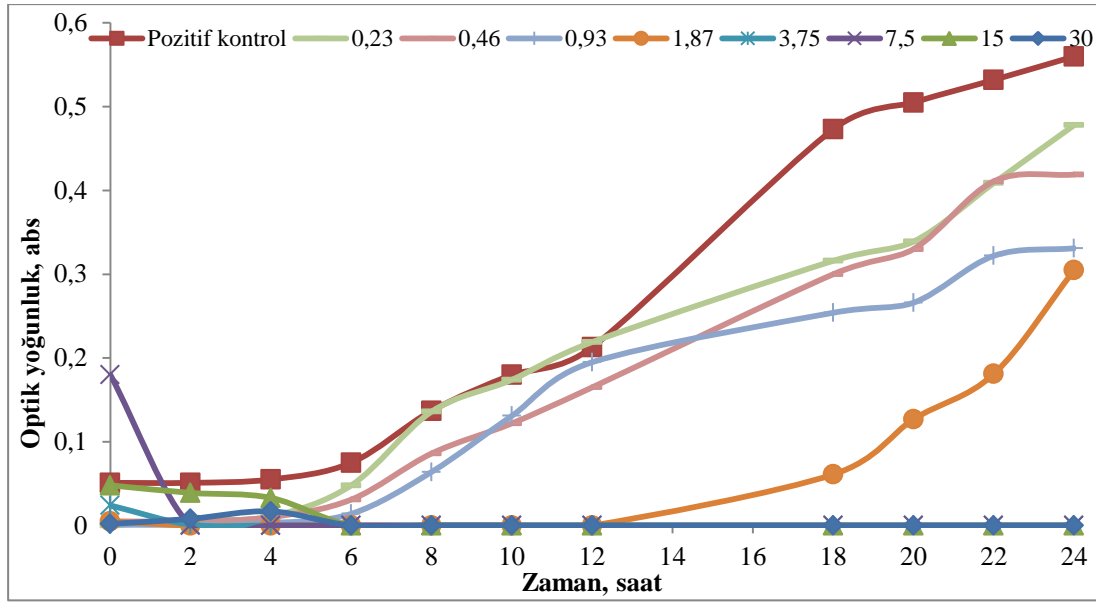
4.2.2.1 Kekik

Kekik esansiyel yağı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.10 ve Şekil 4.7’de verilmiştir. 3,75-30 µL/mL esansiyel yağ konsantrasyonlarında *S. aureus* bakterisinin tamamının inhibe edildiği belirlenmiştir. 1,87 µL/mL ve azalan yağ konsantrasyonlarında ise bakterilerin optik yoğunluğunun giderek arttığı gözlenmiştir. 1,87 µL/mL esansiyel yağ konsantrasyonunda 18 saatlik inkübasyon süresinden sonra bakteri gelişiminde artış belirlenirken, azalan yağ konsantrasyonlarında 2 saatlik inkübasyon süresinden sonra bakteri gelişiminin sürekli arttığı belirlenmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda çalışılan bütün yağ konsantrasyonlarının bakteri gelişimini etkilediği belirlenmiştir. Tespit edilen bakterilerin optik yoğunluk değerleri her zaman pozitif kontrolün optik yoğunluğundan düşüktür. Kekik esansiyel yağının 0,23 µL/mL konsantrasyonunun *S. aureus*’un %15’ini, 0,46 µL/mL konsantrasyonunun %25’ini, 0,93 µL/mL konsantrasyonunun %41’ini, 1,87 µL/mL konsantrasyonunun %46’sını, 3,75-30 µL/mL aralığındaki konsantrasyonlarının ise %100’ünü inhibe ettiği belirlenmiştir.

Bulanıklık tayini ile belirlenen, kekik esansiyel yağının *S. aureus*’un gelişimini engelleyen minimum konsantrasyonu (MİK) ve petri kutularına ekim sonucu belirlenen *S. aureus*’u öldüren minimum konsantrasyonu (MBK), mikroorganizmaların optik yoğunluğu ile belirlenen değerlerle aynıdır ve 3,75 µL/mL olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10 : Farklı konsantrasyonlardaki kekik esansiyel yağının etkisiyle *S. aureus*’un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu (µL/mL)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,051	0,000	0,005	0,001	0,005	0,024	0,180	0,048	0,002
2	0,051	0,006	0,005	0,001	0,000	0,001	0,000	0,039	0,008
4	0,055	0,011	0,010	0,003	0,000	0,000	0,000	0,033	0,017
6	0,075	0,048	0,031	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,137	0,136	0,086	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,180	0,174	0,122	0,131	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,213	0,219	0,165	0,195	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,473	0,316	0,300	0,254	0,061	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,505	0,339	0,330	0,266	0,127	0,000	0,000	0,000	0,000
22	0,532	0,409	0,411	0,322	0,181	0,000	0,000	0,000	0,000
24	0,560	0,478	0,419	0,331	0,305	0,000	0,000	0,000	0,000



Şekil 4.7 : Kekik esansiyel yağı varlığında *S. aureus*'un gelişimi.

Literatürde gerçekleştirilen çalışmalarda ve bu çalışmada kekik esansiyel yağı için *S. aureus*'a karşı farklı MİK değerleri belirlenmiştir. Bir çalışmada bazı kültür ve yabancı *Thymus broussonetii*, *Thymus maroccanus* ve *Thymus satureioides* kekik türlerinin makrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. *S. aureus*'a karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla; kültür ve yabancı *Thymus broussonetii* için sırasıyla 0,91 mg/mL, 0,9 mg/mL, kültür ve yabancı *Thymus maroccanus* için sırasıyla 0,96 mg/mL, 0,46 mg/mL, kültür ve yabancı *Thymus satureioides* için sırasıyla 1,8 mg/mL, 1,78 mg/mL olarak belirlenmiştir (Bouzidi ve diğ., 2013). Cosentino ve diğ. (1999)'nin yaptıkları başka bir çalışmada kekik esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkisini mikrodilüsyon yöntemiyle araştırmışlardır. *Thymus capitatus* ve *Thymus herba-barona* bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların *S. aureus*'a karşı MİK ve MBK değerleri 0,9 mg/mL tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada *Thymus algerinsis* çiçeğinden elde edilen kekik esansiyel yağının antimikrobiyal etkisi mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. *S. aureus*'un gelişimini engelleyen minimum konsantrasyon (MİK) 0,002 mg/mL, MBK ise 0,003 mg/mL olarak belirlenmiştir (Giweli ve diğ., 2013). Bu çalışmada ise MİK ve MBK değeri 3,24 mg/mL (3,75 µL/mL) tespit edilmiştir. Çalışmalarda aynı kekik yağı için farklı MİK değerleri elde edilmiştir. Dimitrijevic ve diğ. (2007) kekik esansiyel yağının antimikrobiyal etkinlik sağlayan bileşenlerce zengin olduğunu fakat esansiyel yağların bileşimlerinin, esansiyel yağın elde edildiği bitkinin hasat zamanı ve yağın elde edildiği kısma göre farklılık gösterebildiğini bildirmişlerdir.

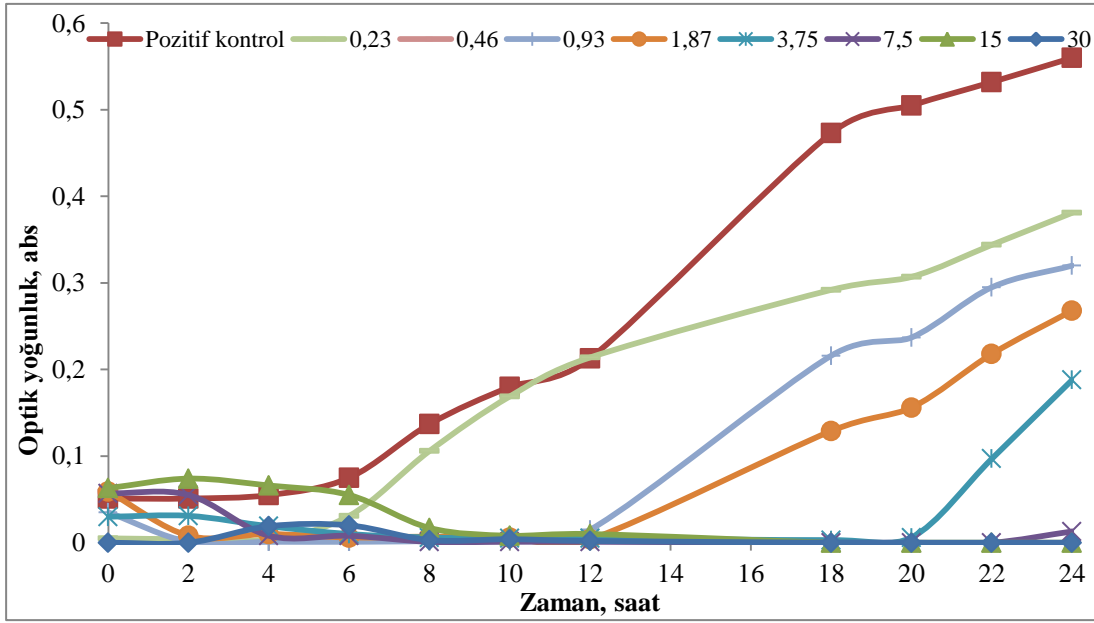
4.2.2.2 Kimyon

Kimyon esansiyel yağı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.11 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. 24 saat sonunda elde edilen mikroorganizmaların optik yoğunluk değerleri 30 ve 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ esansiyel yağ konsantrasyonlarının mikroorganizmaları tamamen inhibe ettiğini göstermiştir. Azalan yağ konsantrasyonlarında ise 24 saat sonundaki *S. aureus* gelişiminin, kuyucuklardaki yağ konsantrasyonu azaldıkça arttığı gözlemlenmiş, belirlenen mikrorrganizma optik yoğunluklarının, pozitif kontrolün optik yoğunluğundan düşük olduğu tespit edilmiştir. Kimyon esansiyel yağının 0,23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu *S. aureus*'un gelişimini %32, 0,46 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu %36, 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu %43, 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu %52, 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu %66 oranında engellerken, 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu %98 oranında engellediği belirlenmiştir.

96 kuyucuklu plaklarda inkübasyon sonucunda negatif kontrolle benzer bulanıklığı gösteren en düşük esansiyel yağ konsantrasyonu 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ olarak tespit edilmiştir. Fakat optik yoğunluk tayinine göre MİK değerinin 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ olduğu belirlenmiştir. Bulanıklık tayini görsel olarak yapılmaktadır ve optik yoğunlukla elde edilen bulgular 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ esansiyel yağ konsantrasyonunda 24 saat sonunda çok az yoğunlukta mikroorganizma gelişimi olduğunu göstermiştir. Optik yoğunluk tayini ile çok daha hassas ölçüm yapıldığı için bulanıklık tayiniyle belirlenemeyen mikroorganizma gelişimleri tespit edilebilmektedir. Bu durum mikropalak okuyucuyla yapılan analizlerin daha hassas olması sebebiyle daha doğru MİK değerleri elde edilebildiğini bildiren Viljoen ve diğ. (2003)'ni desteklemektedir. Petri kutularına ekim sonucu 0,23-3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ aralığında olan petri kutularında çok yoğun, 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonda az yoğun bakteri gelişmiş, artan konsantrasyonlarda ise bakteri gelişmemiştir. Belirlenen MBK değeri optik yoğunluk tayiniyle belirlenen değerle aynıdır ve 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'dir.

Çizelge 4.11 : Farklı konsantrasyonlardaki kimyon esansiyel yağının etkisiyle *S. aureus*'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu (µL/mL)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,051	0,005	0,006	0,035	0,059	0,03	0,057	0,063	0,000
2	0,051	0,004	0,001	0,001	0,008	0,031	0,055	0,074	0,000
4	0,055	0,004	0,001	0,001	0,010	0,019	0,008	0,066	0,019
6	0,075	0,031	0,001	0,001	0,006	0,010	0,008	0,055	0,020
8	0,137	0,106	0,017	0,002	0,007	0,006	0,001	0,017	0,003
10	0,180	0,169	0,076	0,006	0,006	0,005	0,001	0,008	0,004
12	0,213	0,214	0,115	0,015	0,004	0,005	0,001	0,010	0,002
18	0,473	0,292	0,259	0,216	0,129	0,003	0,000	0,000	0,000
20	0,505	0,307	0,292	0,237	0,156	0,006	0,000	0,000	0,000
22	0,532	0,344	0,348	0,295	0,218	0,097	0,000	0,000	0,000
24	0,560	0,381	0,356	0,320	0,268	0,188	0,013	0,000	0,000



Şekil 4.8 : Kimyon esansiyel yağı varlığında *S. aureus*'un gelişimi.

Alam ve diğ. (2010), siyah kimyon çekirdeklerinin etanol ve kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğini makrodilüsyon yöntemiyle araştırmışlardır. *S. aureus* için MİK değeri 1125 µg/mL olarak belirlenmiştir. Makrodilüsyon yönteminin kullanıldığı bir diğer çalışmada Karankı (2013), kimyon ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini araştırmış ve *S. aureus*'un gelişimini engelleyen minimum konsantrasyonu 25 µL/mL olarak belirlemiştir. Gerçekleştirilen çalışmada ise belirlenen MİK değeri 15 µL/mL (13935 µg/mL)'dir ve bu çalışmalarda belirlenen MİK değerleri arasında bir değerdir.

4.2.2.3 Kakule

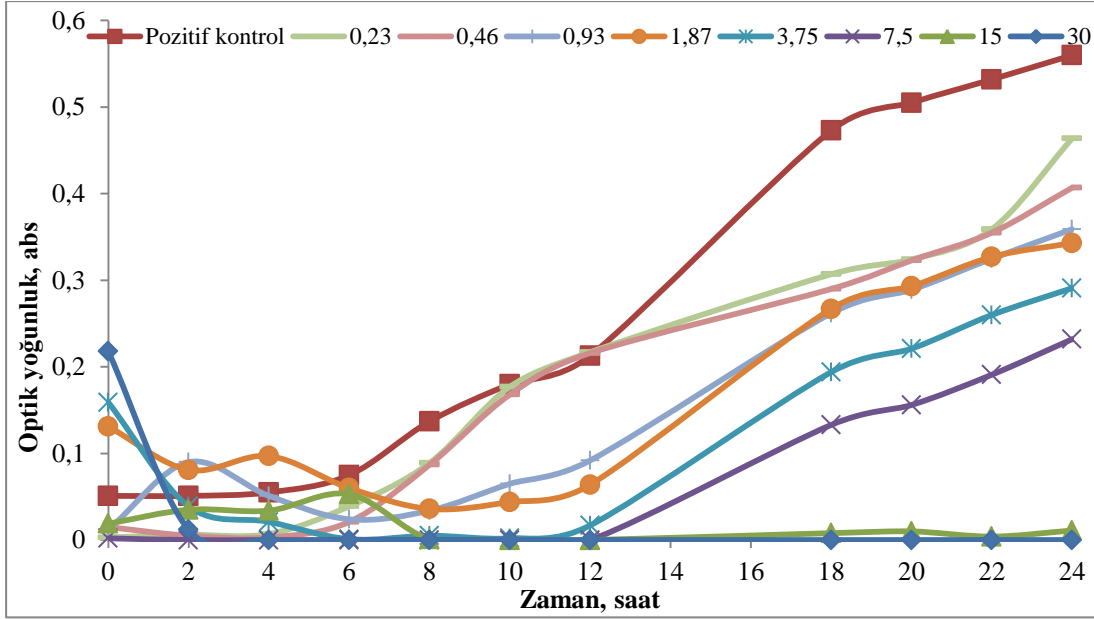
Kakule esansiyel yağı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.12 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Mikroplak okuyucu yardımıyla belirlenen değerler sadece 30

$\mu\text{L}/\text{mL}$ esansiyel yağ konsantrasyonunun *S. aureus*'u tamamen inhibe ettiğini göstermiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda esansiyel yağ konsantrasyonları azaldıkça, esansiyel yağların bakteri gelişimini engelleme oranının da azaldığı tespit edilmiştir. Fakat çalışılan bütün esansiyel yağ konsantrasyonlarında mikroorganizmaların optik yoğunluğunun, pozitif kontrolden düşük olduğu belirlenmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen bulgular doğrultusunda 0,23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyondaki kakule esansiyel yağı *S. aureus*'un gelişimini %17 oranında engellerken, 0,46 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonun %27, 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonun %36, 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonun %39, 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonun %48, 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonun %59, 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonun ise %98 oranında engellediği tespit edilmiştir.

96 kuyucuklu plaklarda 24 saatlik inkübasyon sonunda bulanıklık gözlenmeyen en düşük esansiyel yağ konsantrasyonu 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir. Fakat mikroorganizmaların optik yoğunluğu ile elde edilen bulgular doğrultusunda MİK değerinin 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ olduğu belirlenmiştir. Petri kutularına yapılan ekim sonucunda tespit edilen MBK değeri, optik yoğunluk tayiniyle belirlenen MBK değerini doğrulamıştır ve 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ esansiyel yağ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.12 : Farklı konsantrasyonlardaki kakule esansiyel yağının etkisiyle *S. aureus*'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu ($\mu\text{L}/\text{mL}$)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,051	0,003	0,015	0,012	0,131	0,159	0,002	0,019	0,218
2	0,051	0,006	0,005	0,090	0,081	0,039	0,000	0,035	0,012
4	0,055	0,007	0,003	0,051	0,097	0,021	0,000	0,034	0,000
6	0,075	0,039	0,021	0,024	0,060	0,001	0,000	0,053	0,000
8	0,137	0,089	0,087	0,034	0,036	0,005	0,000	0,001	0,000
10	0,180	0,177	0,168	0,065	0,044	0,002	0,000	0,000	0,000
12	0,213	0,217	0,216	0,092	0,064	0,017	0,000	0,000	0,000
18	0,473	0,307	0,290	0,262	0,267	0,194	0,133	0,008	0,000
20	0,505	0,324	0,323	0,289	0,293	0,221	0,156	0,010	0,000
22	0,532	0,359	0,355	0,325	0,327	0,260	0,191	0,004	0,000
24	0,560	0,464	0,407	0,359	0,343	0,291	0,232	0,011	0,000



Şekil 4.9 : Kakule esansiyel yağı varlığında *S. aureus*'un gelişimi.

Bu çalışmada belirlenen MİK değeri 26,97 mg/mL (30 µL/mL)'dir. Yapılan bir çalışmada kakule (*Elettaria cardamomum*) bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstraktın *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Agar kuyucuk difüzyon yönteminin kullanıldığı çalışmada *S. aureus* için MİK değeri 25 mg/mL olarak belirlenmiştir (Aneja ve Sharma, 2010). Bu değer gerçekleştirilen çalışmada belirlenen değeri doğrulamaktadır.

4.2.2.4 Mercanköşk

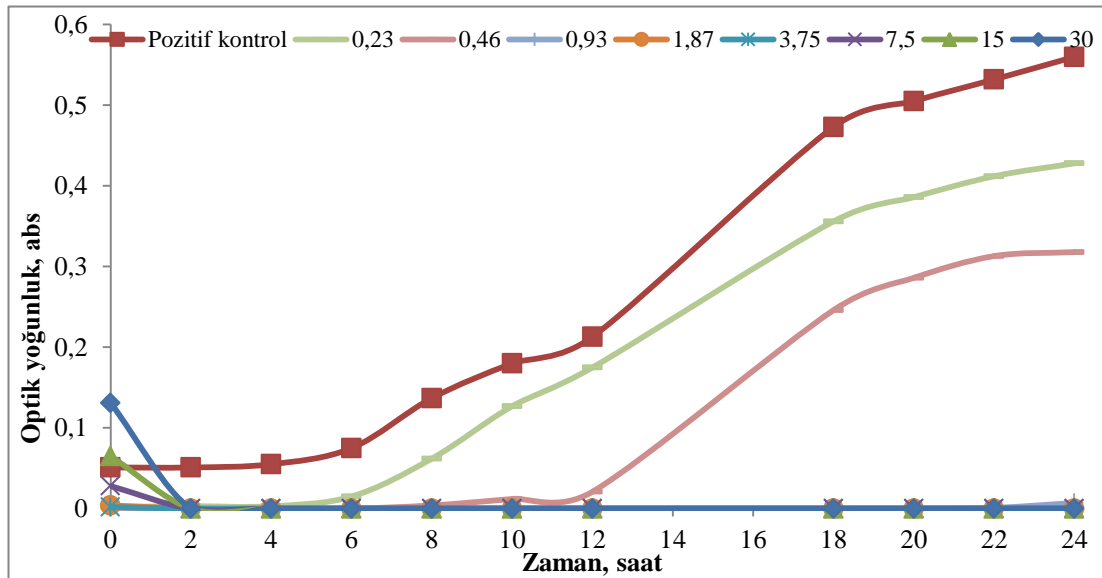
Mercanköşk esansiyel yağı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular Çizelge 4.13 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda 1,87-30 µL/mL esansiyel yağ konsantrasyonu *S. aureus*'u inhibe etmiştir. Esansiyel yağ konsantrasyonu azaldıkça bakterilerin optik yoğunluğunun ise arttığı belirlenmiştir. 1,87-30 µL/mL konsantrasyon aralığında, 2 saatlik inkübasyondan sonra bakterilerin optik yoğunluğunun negatif kontrolün optik yoğunluğundan düşük veya eşit olduğu belirlenmiştir. 0,93 µL/mL yağ konsantrasyonunda ise inkübasyon süresinin 22. saatinde mikroorganizmaların optik yoğunluğunda artış tespit edilmiştir. 24 saat sonunda belirlenen mikroorganizmaların optik yoğunluk değerlerinin her zaman pozitif kontrolün optik yoğunluğundan düşük olduğu tespit edilmiştir. Esansiyel yağ konsantrasyonu azaldıkça yağın bakteri gelişimini engelleme yüzdesi de azalmıştır. Mercanköşk esansiyel yağının 0,23 µL/mL konsantrasyonu %24, 0,46 µL/mL

konsantrasyonu %43, 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ konsantrasyonu ise %99 oranında *S. aureus*'un gelişimini engellemiştir.

Görsel olarak yapılan bulanıklık tayininde belirlenen MİK değeri 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ iken mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen MİK değeri 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'dir. 1,87-30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ esansiyel yağ konsantrasyonlarından petri kutularına yapılan ekim sonucu bakteri gelişimi tespit edilmemiştir. 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ esansiyel yağ konsantrasyonunun bulunduğu kuyucuktan yapılan ekim sonucu petri kutularında çok az, azalan esansiyel yağ konsantrasyonlarının bulunduğu kuyucuklardan yapılan ekim sonucu petri kutularında çok yoğun bakteri gelişimi gözlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda *S. aureus* için mercanköşk esansiyel yağının MBK değeri 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ olarak tespit edilmiştir. Belirlenen MBK değeri, optik yoğunluk tayiniyle belirlenen MBK değerini doğrulamaktadır.

Çizelge 4.13 : Farklı konsantrasyonlardaki mercanköşk esansiyel yağının etkisiyle *S. aureus*'un optik yoğunluğunun inkübasyon süresince değişimi.

Saat	Pozitif kontrol	Esansiyel yağ konsantrasyonu ($\mu\text{L}/\text{mL}$)							
		0,23	0,46	0,93	1,87	3,75	7,5	15	30
0	0,051	0,002	0,001	0,002	0,004	0,002	0,028	0,065	0,131
2	0,051	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,055	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,075	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,137	0,062	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,180	0,127	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,213	0,175	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,473	0,356	0,246	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,505	0,386	0,286	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
22	0,532	0,412	0,313	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	0,560	0,428	0,318	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000



Şekil 4.10 : Mercanköşk esansiyel yağı varlığında *S. aureus*'un gelişimi.

Yapılan bir çalışmada mercanköşk (*Origanum vulgare* L.) esansiyel yağının *S. aureus*'un gelişimini engelleyen minimum konsantrasyonu mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. 620 nm'de spektrofotometrik ölçümle belirlenen MİK değeri 64 µg/mL bulunmuştur (Özkalp ve diğ., 2010). Bir diğer çalışmada Lv ve diğ. (2011), tüp dilüsyon yöntemiyle mercanköşk esansiyel yağının *S. aureus*'u inhibe eden minimum konsantrasyonunu 0,625 µL/mL olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise belirlenen MİK değeri 1757,8 µg/mL (1,87 µL/mL)'dir. Souza ve diğ. (2007) gıda bozulmasına sebep olan mayalar üzerinde mercanköşk esansiyel yağının antimikrobiyal etkisini agar kuyucuk difüzyon ve mikroplak okuyucuda optik yoğunluk analizi ile belirlemişlerdir. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirledikleri MİK değerleri 5-20 µL/mL arasında iken, optik yoğunluk analizi ile belirledikleri MİK değerleri 0,62-1,25 µL/mL arasında değişmiş ve yöntem farklılığının farklı MİK değerlerinin elde edilmesine neden olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca Dimitrijevic ve diğ. (2007) yaptıkları çalışmada antimikrobiyal etkinlik sağladığı düşünülen mercanköşk esansiyel yağının ana bileşeni karvakrolü iz miktarda tespit etmişler ve esansiyel yağların bileşimlerinin yağ elde edilen bitkinin hasat zamanı, elde edildiği kısmı gibi nedenlerle antimikrobiyal aktivitesinin değişebildiğini bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada dereotu, fesleğen, kakule, kekik, kimyon, mercanköşk, rezene, zencefil esansiyel yağlarının gram-negatif *E. coli* ve gram-pozitif *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip 4 yağ belirlenmiş ve seçilen esansiyel yağların 8 farklı konsantrasyonunun (30; 15; 7,5; 3,75; 1,87; 0,93; 0,46; 0,23) *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin gelişimi üzerine etkisi inkübasyon süresince belirli aralıklarla (0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18; 20; 22 ve 24 saat) izlenmiştir. İnkübasyon sonunda MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir.

Çalışmada *E. coli*'ye karşı zencefil, rezene ve fesleğen esansiyel yağları, *S. aureus*'a karşı rezene ve zencefil esansiyel yağları çalışılan konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki göstermemişlerdir. Kekik ve mercanköşk esansiyel yağı 5-10-15 µL esansiyel yağ miktarlarında bakteri gelişimini tamamen inhibe ederken, mercanköşk esansiyel yağı her iki mikroorganizmaya karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon çapları doğrultusunda yapılan antimikrobiyal aktivite değerlendirmesinde etkili 4 esansiyel yağ kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk olarak belirlenmiştir.

Optik yoğunluk tayini ile bulanıklık tayinine göre daha hassas ölçüm yapıldığı için bulanıklık tayiniyle belirlenemeyen mikroorganizma gelişimleri tespit edilebilmiştir. Negatif kontrolle karşılaştırılarak yapılan bulanıklık tayininde *S. aureus* ve *E. coli*'nin gelişimini engelleyen minimum esansiyel yağ konsantrasyonlarının kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında, mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen konsantrasyonlardan farklı olduğu tespit edilmiştir. Bulanıklığın gözlemlenmesiyle elde edilen MİK değerleri *E. coli* için kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 3,75 µL/mL, mercanköşk esansiyel yağında 0,46 µL/mL iken, mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen MİK değerleri kimyon ve kakule esansiyel yağlarında 7,5 µL/mL, mercanköşk esansiyel yağında ise 0,93 µL/mL belirlenmiştir. *S. aureus*'a karşı bulanıklığın gözlemlenmesiyle elde edilen MİK değerleri ise kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında sırasıyla; 7,5

$\mu\text{L}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ iken, mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen MİK değerleri sırasıyla; 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ belirlenmiştir. Kekik esansiyel yağı için ise belirlenen MİK değerleri aynıdır ve *E. coli* için 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *S. aureus* için 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'dir.

Mikroorganizmaların optik yoğunluğuna göre belirlenen MBK değerleri, petri plakalarına yapılan ekimle elde edilen MBK değerlerini doğrular niteliktedir. Elde edilen MBK değerleri kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarında *E. coli* için sırasıyla; 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$; *S. aureus* için sırasıyla 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tespit edilmiştir. *E. coli*'ye karşı en yüksek antimikrobiyal etki kekik ve mercanköşk esansiyel yağlarında, *S. aureus*'a karşı ise mercanköşk esansiyel yağında belirlenmiştir. Kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarına karşı *E. coli*'nin *S. aureus*'a göre daha hassas olduğu tespit edilmiştir.

Esansiyel yağların mikroorganizmaların gelişimi üzerindeki etkisi inkübasyon süresince incelendiğinde mikroorganizmaların optik yoğunluğunda lineer bir artış ya da azalış tespit edilememiştir. Çalışılan esansiyel yağların mikroorganizmanın gelişimini engellediği/öldürdüğü inkübasyon süreleri her yağ ve mikroorganizma için değişkenlik göstermiştir. Fakat 18 saatlik inkübasyon süresi sonunda belirlenen MİK değerlerinin, 24 saat sonunda belirlenen MİK değerleri ile aynı olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan bütün esansiyel yağ konsantrasyonlarında, ölçüm yapılan inkübasyon süreleri sonunda elde edilen mikroorganizmaların optik yoğunluğunun, pozitif kontrolün optik yoğunluğundan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla 24 saat sonunda kabul edilebilir antimikrobiyal etki elde edilemeyen esansiyel yağ konsantrasyonlarının dahi mikroorganizma gelişimini kısmi olarak engellediği belirlenmiştir. Esansiyel yağ konsantrasyonu arttıkça mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etki de artmıştır.

Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek zordur. Çünkü esansiyel yağların elde edildiği bitkilerin hasat zamanı, yağın elde edilme yöntemi, antimikrobiyal analizde kullanılan çözümler, yöntem farklılığı, esansiyel yağların uçucu olmaları gibi birçok etmen belirlenen sonuçlarda farklılıklara sebep olabilmektedir. Bu nedenle literatürde esansiyel yağların MİK ve MBK değerleri ile ilgili kesin sonuçlar yoktur. Yapılan çalışmada da literatür çalışmaları ile birebir uyuşmayan fakat benzer MİK ve MBK değerleri elde edilmiştir.

Yapılan alışmada *E. coli* ve *S. aureus*'un gelişimine farklı esansiyel yağların farklı konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Kakule esansiyel yağının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı etkisi ilk kez değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarının iyi birer doğal antimikrobiyal ajan olabileceklerini göstermiştir. Çok düşük konsantrasyonlarının antimikrobiyal etki göstermesi nedeniyle gıdanın duyuusal özelliklerini etkilemeyeceği ve bu nedenle yaygın olarak kullanılabilenleği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu çalışmanın, esansiyel yağların ayrı ayrı veya farklı kombinasyonlarının çeşitli patojen ve bozulma etkeni mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisiyle ilgili yapılacak ileriki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. and Moss, M.O.**, 1995. Food Microbiology, University of Surrey, Guildford, UK, The Royal Society of Chemistry
- Adıgüzel, A., Güllüce, M., Sengül, M., Ögütçü, H., Sahin, F., Karaman, Ş.**, 2005. Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (*Labiatae*) Extract. Turk J. Biol. 29: 155-160.
- Agaoglu, S., Dostbil, N., & Alemdar, S.**, 2007. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 51, 53–57.
- Alam, M. M., Yasmin, M., Nessa, J., Ahsan, C. R.**, 2010. Antibacterial activity of chloroform and ethanol extracts of black cumin seeds (*Nigella sativa*) against multi-drug resistant human pathogens under laboratory conditions. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(18):1901-1905.
- Altuner, M.E.**, 2008. Bazı karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, s. 26-44, 2008.
- Alzoreky, N.S.and Nakahara, K.**, 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology, 80: 223-230.
- Aneja, K. R., Sharma, C.**, 2010. Antimicrobial potential of fruit extracts of *Elettaria cardamomum* Maton (*Chhoti elaichi*) against the pathogens causing ear infection. Pharmacologyonline 3: 750-756.
- Arda, M.**, 2000. Temel Mikrobiyoloji. 2. baskı. Medisan Yayınevi. Ankara, 80-92.
- Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG.**, 1996. Emerging food borne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world, Epidemiol. Rew, 18: 29-51.
- Badi, H. N., Yazdani, D., Ali, S. M., & Nazari, F.**, 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. Industrial Crops and Products, 19, 231-236.
- Baser, K.H.C., Özek, T., Kırimer, N., Tümen, G.**, 2004. A comparative study of the essential oils of wild and cultivated *Satureja hortensis*. Journal of Essential Oil Research 16: 422-424.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H.**, 2001. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.

- Baytop, T.**, 1986. Farmakognozi Ders Kitabı, Cilt I, İst. Üniv. Yay. İstanbul 1970; 4. baskı: İst. Üniv. Yay. No.3399, Ecz. Fak. Yay. No.51, Taş Matbaası, İstanbul.
- Bell, C. and Kyriakides, A.**, 2002. Pathogenic *Escherichia coli* in: Foodborne pathogens, Hazard, risk analysis and control, Edited by; Blacburn, C.W., McClure, J., CRC Press, Washington, DC,279-306.
- Benli, M. ve Yigit, N.**, 2005. Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyel aktivitesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 03(08):1-8.
- Berk, A.**, 1953. Esanslar (Eterik yağlar), İstanbul Hüsnu Tabiat Matbaası
- Bilgehan H.**, 2000. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi, İzmir; 239-268.
- Bouzidi, L. E., Jamali, C. A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A.**, 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. Industrial Crops and Products, 43:450-456.
- Burt, S.**, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cengiz A.T.**, 1999. Staphylococcus. Ustacelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Guneş Kitabevi, Ankara; 339-346.
- Ceylan, A.**, 1987. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler), Ege Üniversitesi Yay. Yayın no: 481, İzmir, 188 sayfa.
- Coia, J.E.**, 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 20, 1-9.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F.**, 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29:130-135.
- Coskun, F.**, 2006. Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2: 27-33.
- Cutter, C.N.**, 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Eshericia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63 (5), 601-607.
- Çelik, E. ve Çelik, G.Y.**, 2007. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyel özellikleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 05(2):1-6.
- Davidson, P. M.**, 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food microbiology Fundamentals and Frontiers*, Doyle, M.P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (eds), pp. 520-56, ASM Press, New York.

- Davidson, P.M. and Naidu, E.S.,** 2000. Phyto-Antimicrobials in *Natural Food Antimicrobial Systems*, Eds. Naidu A.S., CRC Press, (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)
- Davidson, P.M., Parish, M.E.,** 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43, 148–155.
- Deans, S. G. & Ritchie, G.,** 1987. Antimicrobial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165-180.
- Deans, S.G., Simpson, E., Noble, R.C., MacPherson, A., Penzes, L.,** 1993. Natural antioxidants from *Thymus vulgaris* (thyme) volatile oil: the beneficial effects upon mammalian lipid metabolism. *Acta Horticulturae* 332, 177– 182.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G.,** 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
- Diao, W.R., Hu, Q. P., Zhang, H., Xu, J.G.,** 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**. 35, 109-116.
- Dimitrijevic, S. I., Mihajlovski, K. R., Antonovic, D. S., Milanovic-Stevanovic, M. R., Mijin, D. Z.,** 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food chemistry*, 104:774-782.
- Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M.C., Desjobert, J.M., Bolla, J.M., Costa, J., Berti, L., Luciani, A., Muselli, A.,** 2013. Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control* 30, 354-363.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G.,** 2000. Antimicrobial agents from plants, antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- Dovgich, N. A.,** 1971. Antimicrobial effect of essential oils. *Mikrobiol. Zh. A.N.U.R.S.R.* 33, 253.
- Doyle MP and Cliver DO.,** 1990. *Escherichia coli*, Chapter 13, “Foodborne Diseases”, Ed, DO Cliver, 209-215, Academic Press, Inc, San Diego, California 92101, USA.
- Dua, A., Gaurav, G., Balkar, S. and Mahajan, R.,** 2013. Antimicrobial properties of methanolic extract of cumin (*Cuminum cyminum*) seeds. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 4(1), 104-107.
- Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O’Brien, S., Butler, F.,** 2006. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science*, 74, 76-88.

- Evans, W.C.**, 1996. Trease and Evans Pharmacognosy, 14th edition, University of Nottingham, WB. Sanders Company, Nottingham, UK.
- Evren, M., Tekgüler, B.**, 2011. Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR 9, 3: 28-40. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110304.pdf Fact sheet 237, revised January 2002. Geneva.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pages, J. M., Hassan, L.**, 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19: 464-471.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A.**, 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52 (9), 665– 667.
- Firouzi, R., Shekarforoush, S. S., Nazer, A. H. K., Borumand, Z., & Jooyandeh, A. R.**, 2007. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. *Journal of Food Protection*, 70, 2626-2630.
- Fleming-Jones, M., & Smith, R.**, 2003. Volatile organic compounds in foods: a five year study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8120–8127.
- Friedly, E. C., Crandall, P. G., Ricke, S. C., Roman, M., O’Bryan, C., & Chalova, V. I.**, 2009. *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science*, 74, M67-M72.
- Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E. & Mandrell, R. E.**, 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enterica in apple juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6042–6048.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E.**, 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enterica. *Journal of Food Protection* 65 (10), 1545-1560.
- Gavanji, Shahin., Mohammadi, Elmira., Larki, Behrouz., Bakhtari.**, 2014. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of some herbal essential oils in comparison with common antibiotics in bioassay condition. *Integr med res* 3, 142-152.
- Genigeorgis, C. A.**, 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology*, 9, 327- 360.
- Giese, J.**, 1994. Spices and seasoning blends: A taste for all seasons. *Food Technol.* 48(4):87-98.
- Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., & Nerin, C.**, 2009. [Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils](#). *Food Chemistry* 116 (4), 982-989.

- Gould, G.W.**, 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 82-86.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P.**, 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1) 91-97.
- Halkman, A. K., Noveir, M. R., Doğan, H. B.**, 2001, *Escherichia coli* O157: H7 Serotipi, Sim Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 43s.
- Hammer K. A., Carson C.F., and Riley T. V.**, 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology* 86, 985-990.
- Haşimi, N., Tolan, V., Kızıl, S., Kılınç, E.**, 2014. Anason (*Pimpinella anisum* L.) ve kimyon (*Cuminum cyminum* L.) tohumlarının uçucu yağ kompozisyonu ile antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 20: 19-26.
- Holley, R.A., Patel, D.**, 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22:273- 292.
- Hu, Haobin., Zheng, Xudong., Huaisheng**, 2012. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of the essential oil from the leaves of *Acanthopanax leucorrhizus* (Oliv.) Harms. *Environmental toxicology and pharmacology* 34, 618-623.
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., Dufosse L.**, 1998. Les Propriétés Antimicrobiennes des Huiles Essentielles et Composés D'arômes. *Sci. Aliments*, 18, 563-582.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., Przybylski, R.**, 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, 108: 986-995.
- İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Baser, K.H.C., Kıvanç, M.**, 2002. Bazı Umbelliferae türlerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyel etkileri. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler* (29-31 Mayıs, Eskisehir):355-366. ISBN 975-94077-2-8.
- Jacob, C., Mathiasen, L., & Powell, D.**, 2010. Designing effective messages for microbial food safety hazards. *Food Control*, 21, 1–6.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A.**, 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976– 1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica* 53, 396–398.
- Jo, M., Kim, J., Lim, J., Kang, M., Koh, H., Park, Y., Yoon, D., Chae, J., Eo, S., Lee, J.H.**, 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 from major food animals in Korea, *Int. J. Of Food Microbiol.*, 95, 41-49.
- Kalembe, D., & Kunicka, A.**, 2003. *Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current medicinal chemistry*, 10, 813-829.

- Karankı, E.,** 2013. Ülkemizde yaygın olarak kullanılan bazı baharatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Niğde Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karapınar, M. ve Aktuğ, Ş.E.,** 1986. Baharatların antimikrobiyal etkileri I. Bitkinin yaprak veya çiçek kısmından köken alan baharatlar, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, B4(2), 115-126.
- Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., Schmidt, H.,** 1999. Epidemiology and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 34, 229-243.
- Kırbağ S., Bağcı E.,** 2000. *Picea abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma, *Journal of Qafqaz University*, III (I), 183-190.
- Kim, S-Y., Kang, D-H., Kim, J-K, Ha, Y-G, Hwang, J. Y., Kim, T., & Lee, S-H.,** 2011. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of Food Science*, 76, M41-M46.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C.,** 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, pp, 785-856.
- Korukluoğlu, M., Sertel, S., Karakaş, R.,** 2005. *Salmonella* ve *Shigella*'nın gelişmesini engelleyen tıbbi bitkiler ve esansiyel yağlar, *Gıda Kongresi 2005*. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir, 19-21 Nisan, s. 334-337.
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P., Boulamatsis, A.,** 2006. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT*. 41:119-127.
- Kuropka, G., Neugebauer, M., & Glombitza, K. W.,** 1991. Essential oils of *Achillea ptarmica*. *Planta Medica*, 57, 492-494.
- Lacroix, M., Saucier, L., Caillet, S., Qussalah.,** 2006. Inhibitory effects of selected plant essential oils on growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(5): 414-420.
- Lopez-Malo Vigil, A., Palou, E., & Alzamora, S. M.,** 2005. Naturally occurring compounds plant sources. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3rd ed., pp. 429–446). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M. and Guerrero, S.,** 2000. Natural Antimicrobials from Plants, *In Minimally Processed Fruits and Vegetables : fundamental aspects and applications*, pp. 237-263, Eds. Alzamora, S.M., Tapia, M.S. and López-Malo, A., Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland.

- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, C.,** 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44:3057-3064.
- Mann, C.M., Markham, J.L.,** 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84, 538– 544.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G.,** 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 62 (9), 1017– 1023.
- Murray, R. J.,** 2005. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Internal Medicine Journal*, 35, S106-S119.
- Novak, J., Draxler, L., Gohler, I. & Franz, C. M.,** 2005. Essential oil composition of *Vitex agnus-castus* - comparison of accessions and different plant organs. *Flavor and Fragrance Journal*. 20, 186-192.
- Nychas, G.J.E. and Skandamis, P.N.,** 2003. Antimicrobials from herbs and spices in *Natural Antimicrobials for Minimal Processing of Foods*, Ch 9, Eds. Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N & Tassou, C.C., CRC Press (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)
- Oke, Feyza., Aslim, Belma., Ozturk, Sahlan., Altundag, Senol.,** 2009. *Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia Ten.* *Food chemistry* 112, 874-879.
- Olawore, N. O., Ogunwande, I. A., Ekundayo, O. & Adeleke, K. A.,** 2005. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.), *Flavor and Fragrance Journal*, 20, 54-56.
- Olonisakin, A., Oladimeji, M. O., & Lagide, L.,** 2007. Composition and antibacteria activity of steam distilled oil from *Xylopiya aethipica* and *Syzgium aromaticum*. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2(1), 236–240.
- Onyeagba, R. A., Ugbogu, O. C., Okeke, C. U., Iroakasi, O.,** 2004. Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn). *African Journal of Biotechnology*, 3: 552-554.
- Ötük, G.,** 1992. Antibiyogramların değerlendirilmesi. *Antibiyotikler*, s. 11-17.
- Özkalp, B., Sevgi, F., Özcan, M., Özcan, M. M.,** 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Journal of Food, Agriculture&Environment* Vol. 8 (2): 272-274.
- Packiyasothy, E.V., Kyle, S.,** 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia* 54 (9), 384– 387.
- Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H. and Ravid, U.,** 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11: 33-7.

- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U. and Juven, B.,** 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection* 58: 81-85.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J.,** 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 15– 19.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, Ignacimuthu, S.,** 2006. M., *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39. *Protection* 65 (10), 1545– 1560.
- Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J.M., Michel, G.M., Baccou, J.C.,** 1995. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research* 7, 165– 173.
- Rasheed, E. M., Hamudi, M., Rasheed, K. M.,** 2010. Antimicrobial activity and the median lethal dose of dill (*Anethum graveolens*) extract. *Diyala Agricultural Sciences Journal*, 2(1): 16-27.
- Rasooli, I., Rezaei M.B., Allameh, A.,** 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International J. of Infections Diseases* 10(3): 236-241.
- Ravichandran, M., Hettiarachchy, N. S., Ganesh, V., Ricke, S. C., & Singh, S.,** 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31, 462-471.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A.,** 1988. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127– 149.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., las Rivas, B. D., De Felipe, F. L., Gómez- Cordovés, G., et al.,** 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79–90.
- Roura, S.I., Valle, C.E., Ponce, A.G., Moreira, M.R.,** 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food born pathogen. *LWT - Food Science and Technology*. 38(5): 565-570.
- Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A.,** 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3741-3746.
- Sadeghian, S., Neyestani, T. R., Shirazi, M. H., Ranjbarian, P.,** 2005. Bacteriostatic effect of dill, fennel, caraway and cinnamon extracts against *Helicobacter pylori*. *Journal of Nutritional&Environmental Medicine*, 15: 47-55.

- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J.,** 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77 (4): 279-285.
- Senatore, F.,** 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1327– 1332.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H. L. ve Yuk, H.-G.,** 2013. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Food Science & Technology Programme*.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M.,** 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1202-1205.
- Smith- Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L.,** 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food microbiology* 18: 463-70.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L.,** 1998. Antimicrobial 885 properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118-122.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & van Griensven, L. J. L. D.,** 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15, 7532–7546.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G.,** 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 136-141.
- Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N. and Filho, J.M.B.,**2005. “Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems”, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 549-558.
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., Trajano, V. N.,** 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food control*, 18:409-413.
- Şarer, E., Pañçalı, S., Yıldız, S.,** 1996. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesi. *Ankara Ecz. Fak. Der.*, 25, (1): 29-38.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O.,** 2010. “Antimicrobial herb and spice compounds in food”, *Food Control* 21, 1199-1218.
- Takikawa, A., Keiko, A., Yamamoto, M., Ishimaru, S., Yasui, M, Okubo, Y. and Yokoigawa, K.,** 2002. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* 0157. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (4), 315-320.
- Tassaou, C.C., Nycas, J.E. and Scandamis P.N.,** 2004. Herbs and spices, in *Handbook of Herbs and Spices*, ch 3, Eds. Peter, K. V., Woodhead Publishing Ltd., England.

- Teixeria, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L.,** 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*. 43, 587– 595.
- Toroğlu, S. ve enet M.,** 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9: 12-20.
- Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M.,** 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi. *Food control*. 1073-1079.
- Uçan, F.,** 2008. DL-Limonenin mayalar üzerine antifungal etkisi. .Ü., FenBil. Enst.,Biyoteknoloji ABD., Yüksek lisans tezi. Adana. 62 s.
- Ultee, A., Bennink, M.H.J., Moezelaar, R.,** 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4), 1561–1568. PhD thesis, ISBN 90- 5808-219-9.
- Unluturk, A., Turantas, F.,** 1998. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, 1. Baskı, İzmir, 134- 136.
- Üner Y., Aksu H. ve Ergün Ö.,** 2000. Baharatın eşitli Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi VETFAK dergi, 1.
- Valero, M. and Salmeron, M.C.,** 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 73-81.
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B., Rowshan, V.,** 2014. Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany* 93: 92–97.
- Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J.,** 1999. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 116p.
- Viljoen, A., Van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Baser, H.,** 2003. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae)—the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 137–143.
- Waldvogel F.A.,** 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone; 2069-2092.
- Wanda, P., Cupp, J., Snipes, W., Keith, A., Rucinsky, T., Polish, L. and Sands, J.,** 1976. Inactivation of the enveloped bacteriophage o6 by butylated hydro-xytoluene and butylated hydroxyanisole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10 96.

- Wendakoon, C. N., & Sakaguchi, M.,** 1993. Combined effect of sodium-chloride and clove on growth and biogenic-amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection*, 56, 410-413.
- WHO,** 2002a. WHO global strategy for food safety: safer food for better health (pp. 1). Geneva: World Health Organization 92 4 154574 7.
- WHO,** 2002b. Food safety and foodborne illness. World Health Organization
- Witkowska, A. M., Hickey, D. K. & Wilkinson, M. G.,** 2014. Effect of variation in food components and composition on the antimicrobial activity of oregano and clove essential oils in broth and in a reformulated reduced salt vegetable soup product. *Journal of Food Research*. 3: 92-106.
- Yang, X and Wang, H,** 2014. Pathogenic E. coli. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1:695 701.
- Yavuz, H. N.,** 2014. Kekik ve kakule esansiyel yağlarının antifungal etkisinin araştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Müh. Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, İstanbul.

EKLER

EK A: Kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

EK B : Kekik, kimyon, kakule, mercanköşk esansiyel yağlarının *S. aureus* ve *E. coli* için MBK değerlerinin belirlenmesi.

EK A : Kekik, kimyon, kakule ve mercanköşk esansiyel yağlarının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Çizelge A.1 : Kekik esansiyel yağının *E. coli* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark	0,46	Negatif kontrol	Fark	0,93	Negatif kontrol	Fark	1,87	Negatif kontrol	Fark	3,75	Negatif kontrol	Fark	7,5	Negatif kontrol	Fark	15	Negatif kontrol	Fark	30	Negatif kontrol	Fark
0	0,049	0,082	0,078	0,004	0,076	0,077	0,000	0,091	0,096	0,000	0,206	0,253	0,000	0,381	0,382	0,000	1,137	1,318	0,000	1,719	1,785	0,000	1,965	2,028	0,000
2	0,050	0,089	0,081	0,008	0,080	0,076	0,004	0,087	0,087	0,000	0,138	0,162	0,000	0,275	0,275	0,000	0,749	0,763	0,000	1,181	1,240	0,000	1,479	1,568	0,000
4	0,065	0,079	0,061	0,018	0,065	0,063	0,002	0,066	0,066	0,000	0,100	0,100	0,000	0,167	0,168	0,000	0,375	0,398	0,000	0,820	0,822	0,000	1,091	1,121	0,000
6	0,158	0,125	0,061	0,064	0,084	0,063	0,021	0,066	0,066	0,000	0,089	0,089	0,000	0,151	0,151	0,000	0,318	0,327	0,000	0,605	0,611	0,000	0,959	0,960	0,000
8	0,250	0,184	0,062	0,122	0,140	0,063	0,077	0,067	0,067	0,000	0,085	0,085	0,000	0,137	0,140	0,000	0,283	0,288	0,000	0,520	0,545	0,000	0,899	0,936	0,000
10	0,312	0,218	0,061	0,157	0,169	0,066	0,103	0,068	0,069	0,000	0,084	0,084	0,000	0,131	0,134	0,000	0,265	0,266	0,000	0,485	0,486	0,000	0,855	0,855	0,000
12	0,383	0,252	0,065	0,187	0,191	0,070	0,121	0,069	0,070	0,000	0,082	0,082	0,000	0,130	0,133	0,000	0,253	0,256	0,000	0,459	0,460	0,000	0,812	0,852	0,000
18	0,792	0,468	0,130	0,338	0,296	0,119	0,177	0,078	0,078	0,000	0,074	0,080	0,000	0,131	0,132	0,000	0,158	0,158	0,000	0,298	0,347	0,000	0,810	0,846	0,000
20	0,873	0,526	0,144	0,382	0,327	0,112	0,215	0,080	0,080	0,000	0,078	0,082	0,000	0,133	0,133	0,000	0,153	0,153	0,000	0,293	0,339	0,000	0,805	0,840	0,000
22	0,866	0,565	0,164	0,401	0,380	0,137	0,243	0,081	0,082	0,000	0,074	0,085	0,000	0,130	0,131	0,000	0,146	0,153	0,000	0,283	0,321	0,000	0,784	0,818	0,000
24	0,886	0,638	0,233	0,405	0,474	0,122	0,352	0,078	0,080	0,000	0,076	0,080	0,000	0,119	0,124	0,000	0,143	0,155	0,000	0,266	0,311	0,000	0,731	0,758	0,000

Çizelge A.2 : Kimyon esansiyel yağının *E. coli* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark	0,46	Negatif kontrol	Fark	0,93	Negatif kontrol	Fark	1,87	Negatif kontrol	Fark	3,75	Negatif kontrol	Fark	7,5	Negatif kontrol	Fark	15	Negatif kontrol	Fark	30	Negatif kontrol	Fark
0	0,049	0,099	0,087	0,012	0,118	0,129	0,000	0,252	0,340	0,000	0,703	0,791	0,000	1,516	1,588	0,000	1,968	2,139	0,000	2,291	2,449	0,000	2,444	2,549	0,000
2	0,050	0,088	0,080	0,008	0,087	0,087	0,000	0,141	0,137	0,004	0,198	0,227	0,000	0,491	0,710	0,000	0,974	1,470	0,000	1,556	1,962	0,000	1,954	2,190	0,000
4	0,065	0,076	0,067	0,009	0,071	0,071	0,000	0,076	0,074	0,002	0,102	0,102	0,000	0,254	0,257	0,000	0,357	0,391	0,000	1,014	1,393	0,000	1,761	1,880	0,000
6	0,158	0,125	0,068	0,057	0,086	0,071	0,015	0,075	0,077	0,000	0,079	0,086	0,000	0,117	0,118	0,000	0,205	0,207	0,000	0,365	0,365	0,000	0,230	0,513	0,000
8	0,250	0,176	0,071	0,105	0,143	0,072	0,071	0,078	0,082	0,000	0,077	0,087	0,000	0,099	0,101	0,000	0,123	0,127	0,000	0,174	0,199	0,000	0,199	0,258	0,000
10	0,312	0,222	0,072	0,150	0,169	0,073	0,096	0,086	0,084	0,002	0,076	0,087	0,000	0,098	0,098	0,000	0,114	0,117	0,000	0,151	0,151	0,000	0,152	0,160	0,000
12	0,383	0,254	0,074	0,180	0,207	0,075	0,132	0,112	0,084	0,028	0,079	0,089	0,000	0,096	0,097	0,000	0,108	0,113	0,000	0,139	0,142	0,000	0,132	0,136	0,000
18	0,792	0,52	0,069	0,451	0,393	0,072	0,321	0,271	0,083	0,182	0,141	0,079	0,062	0,102	0,091	0,011	0,099	0,107	0,000	0,101	0,104	0,000	0,075	0,083	0,000
20	0,873	0,555	0,071	0,484	0,430	0,074	0,356	0,299	0,083	0,216	0,160	0,068	0,092	0,109	0,091	0,018	0,099	0,107	0,000	0,098	0,104	0,000	0,074	0,083	0,000
22	0,866	0,585	0,069	0,516	0,461	0,075	0,386	0,356	0,081	0,275	0,193	0,070	0,123	0,123	0,092	0,031	0,099	0,106	0,000	0,098	0,102	0,000	0,073	0,082	0,000
24	0,886	0,656	0,070	0,586	0,554	0,078	0,476	0,430	0,080	0,350	0,301	0,070	0,231	0,125	0,091	0,034	0,094	0,107	0,000	0,095	0,095	0,000	0,071	0,081	0,000

Çizelge A.3 : Kakule esansiyel yağının *E. coli* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark	0,46	Negatif kontrol	Fark	0,93	Negatif kontrol	Fark	1,87	Negatif kontrol	Fark	3,75	Negatif kontrol	Fark	7,5	Negatif kontrol	Fark	15	Negatif kontrol	Fark	30	Negatif kontrol	Fark
0	0,049	0,089	0,095	0,000	0,125	0,134	0,000	0,247	0,268	0,000	0,583	0,531	0,052	1,172	1,088	0,084	1,761	1,662	0,099	2,178	2,129	0,049	2,373	2,364	0,009
2	0,050	0,093	0,089	0,004	0,103	0,101	0,002	0,139	0,149	0,000	0,290	0,257	0,033	0,449	0,589	0,000	0,892	1,264	0,000	1,783	1,851	0,000	1,964	1,978	0,000
4	0,065	0,083	0,069	0,014	0,082	0,073	0,009	0,089	0,080	0,009	0,122	0,109	0,013	0,257	0,293	0,000	0,271	0,493	0,000	1,203	1,324	0,000	1,895	1,866	0,029
6	0,158	0,132	0,071	0,061	0,120	0,075	0,045	0,116	0,080	0,036	0,113	0,093	0,020	0,151	0,148	0,003	0,325	0,347	0,000	0,374	0,449	0,000	1,389	1,364	0,025
8	0,250	0,173	0,071	0,102	0,144	0,074	0,070	0,148	0,081	0,067	0,139	0,090	0,049	0,141	0,121	0,020	0,173	0,200	0,000	0,363	0,434	0,000	0,555	0,557	0,000
10	0,312	0,219	0,071	0,148	0,189	0,077	0,112	0,182	0,083	0,099	0,174	0,090	0,084	0,153	0,115	0,038	0,154	0,167	0,000	0,255	0,286	0,000	0,240	0,246	0,000
12	0,383	0,255	0,064	0,191	0,223	0,076	0,147	0,196	0,080	0,116	0,176	0,097	0,079	0,172	0,113	0,059	0,144	0,158	0,000	0,216	0,242	0,000	0,266	0,301	0,000
18	0,792	0,559	0,062	0,497	0,456	0,072	0,384	0,306	0,078	0,228	0,206	0,083	0,123	0,183	0,109	0,074	0,136	0,155	0,000	0,144	0,245	0,000	0,153	0,161	0,000
20	0,873	0,585	0,062	0,523	0,503	0,071	0,432	0,35	0,071	0,279	0,237	0,080	0,157	0,197	0,109	0,088	0,140	0,154	0,000	0,143	0,241	0,000	0,121	0,128	0,000
22	0,866	0,627	0,063	0,516	0,541	0,066	0,386	0,397	0,070	0,275	0,270	0,078	0,123	0,216	0,111	0,031	0,141	0,153	0,000	0,141	0,239	0,000	0,119	0,124	0,000
24	0,886	0,681	0,065	0,586	0,600	0,063	0,476	0,498	0,070	0,350	0,292	0,075	0,231	0,238	0,109	0,034	0,142	0,155	0,000	0,137	0,206	0,000	0,112	0,118	0,000

Çizelge A.4 : Mercanköşk esansiyel yağının *E. coli* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark 0,46	Negatif kontrol	Fark 0,93	Negatif kontrol	Fark 1,87	Negatif kontrol	Fark 3,75	Negatif kontrol	Fark 7,5	Negatif kontrol	Fark 15	Negatif kontrol	Fark 30	Negatif kontrol	Fark							
0	0,049	0,078	0,08	0,000	0,061	0,061	0,000	0,146	0,073	0,073	0,104	0,104	0,000	0,341	0,394	0,000	0,704	0,953	0,000	1,587	1,578	0,009	1,776	1,710	0,066
2	0,050	0,086	0,079	0,007	0,062	0,061	0,000	0,132	0,070	0,062	0,098	0,092	0,006	0,246	0,272	0,000	0,628	0,702	0,000	1,047	0,927	0,120	1,278	1,125	0,153
4	0,065	0,074	0,064	0,010	0,062	0,063	0,000	0,129	0,069	0,060	0,094	0,086	0,008	0,159	0,161	0,000	0,429	0,451	0,000	0,904	0,862	0,042	1,079	0,920	0,159
6	0,158	0,124	0,065	0,059	0,063	0,067	0,000	0,124	0,069	0,055	0,094	0,083	0,011	0,146	0,150	0,000	0,333	0,339	0,000	0,602	0,556	0,046	0,912	0,754	0,158
8	0,250	0,178	0,066	0,112	0,064	0,070	0,000	0,126	0,069	0,057	0,090	0,080	0,010	0,141	0,141	0,000	0,294	0,278	0,016	0,537	0,534	0,003	0,799	0,717	0,082
10	0,312	0,210	0,066	0,144	0,066	0,070	0,000	0,127	0,068	0,059	0,085	0,079	0,006	0,137	0,136	0,001	0,276	0,249	0,027	0,488	0,484	0,004	0,770	0,685	0,085
12	0,383	0,246	0,074	0,172	0,078	0,077	0,001	0,113	0,065	0,048	0,082	0,075	0,007	0,132	0,133	0,000	0,261	0,213	0,048	0,455	0,431	0,024	0,720	0,669	0,051
18	0,792	0,370	0,077	0,293	0,112	0,063	0,049	0,067	0,065	0,002	0,080	0,074	0,006	0,131	0,125	0,006	0,223	0,237	0,000	0,394	0,422	0,000	0,592	0,622	0,000
20	0,873	0,387	0,082	0,305	0,113	0,062	0,051	0,069	0,068	0,001	0,080	0,075	0,005	0,130	0,122	0,008	0,232	0,235	0,000	0,392	0,419	0,000	0,589	0,605	0,000
22	0,866	0,426	0,087	0,339	0,113	0,062	0,051	0,072	0,069	0,003	0,080	0,077	0,003	0,128	0,120	0,008	0,217	0,230	0,000	0,376	0,401	0,000	0,579	0,596	0,000
24	0,886	0,510	0,084	0,426	0,113	0,062	0,051	0,069	0,069	0,000	0,073	0,075	0,000	0,101	0,103	0,000	0,172	0,189	0,000	0,362	0,374	0,000	0,574	0,597	0,000

Çizelge A.5 : Kekik esansiyel yağının *S. aureus* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark	0,46	Negatif kontrol	Fark	0,93	Negatif kontrol	Fark	1,87	Negatif kontrol	Fark	3,75	Negatif kontrol	Fark	7,5	Negatif kontrol	Fark	15	Negatif kontrol	Fark	30	Negatif kontrol	Fark
0	0,051	0,053	0,053	0,000	0,063	0,058	0,005	0,066	0,065	0,001	0,107	0,102	0,005	0,246	0,222	0,024	0,646	0,466	0,18	1,15	1,102	0,048	1,632	1,630	0,002
2	0,051	0,062	0,056	0,006	0,064	0,059	0,005	0,065	0,064	0,001	0,089	0,120	0,000	0,167	0,166	0,001	0,350	0,341	0,000	0,668	0,629	0,039	0,838	0,830	0,008
4	0,055	0,068	0,057	0,011	0,070	0,060	0,010	0,067	0,064	0,003	0,087	0,114	0,000	0,155	0,160	0,000	0,277	0,302	0,000	0,451	0,418	0,033	0,845	0,828	0,017
6	0,075	0,104	0,056	0,048	0,091	0,060	0,031	0,081	0,067	0,014	0,083	0,099	0,000	0,141	0,153	0,000	0,230	0,289	0,000	0,372	0,373	0,000	0,686	0,702	0,000
8	0,137	0,193	0,057	0,136	0,146	0,060	0,086	0,131	0,067	0,064	0,081	0,095	0,000	0,140	0,141	0,000	0,224	0,340	0,000	0,341	0,451	0,000	0,643	0,693	0,000
10	0,180	0,232	0,058	0,174	0,182	0,060	0,122	0,197	0,066	0,131	0,080	0,094	0,000	0,138	0,139	0,000	0,219	0,279	0,000	0,334	0,415	0,000	0,633	0,751	0,000
12	0,213	0,278	0,059	0,219	0,226	0,061	0,165	0,258	0,063	0,195	0,080	0,093	0,000	0,137	0,137	0,000	0,214	0,295	0,000	0,318	0,350	0,000	0,620	0,737	0,000
18	0,473	0,371	0,055	0,316	0,352	0,052	0,300	0,311	0,057	0,254	0,130	0,069	0,061	0,135	0,135	0,000	0,158	0,188	0,000	0,198	0,261	0,000	0,617	0,724	0,000
20	0,505	0,391	0,052	0,339	0,382	0,052	0,330	0,326	0,060	0,266	0,196	0,069	0,127	0,121	0,135	0,000	0,146	0,180	0,000	0,209	0,309	0,000	0,606	0,619	0,000
22	0,866	0,458	0,049	0,409	0,465	0,054	0,411	0,383	0,061	0,322	0,252	0,071	0,181	0,115	0,115	0,000	0,145	0,180	0,000	0,204	0,306	0,000	0,593	0,615	0,000
24	0,886	0,526	0,048	0,478	0,470	0,051	0,419	0,390	0,059	0,331	0,312	0,007	0,305	0,103	0,113	0,000	0,142	0,170	0,000	0,192	0,299	0,000	0,516	0,607	0,000

Çizelge A.6 : Kimyon esansiyel yağının *S. aureus* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark	0,46	Negatif kontrol	Fark	0,93	Negatif kontrol	Fark	1,87	Negatif kontrol	Fark	3,75	Negatif kontrol	Fark	7,5	Negatif kontrol	Fark	15	Negatif kontrol	Fark	30	Negatif kontrol	Fark
0	0,051	0,066	0,061	0,005	0,082	0,076	0,006	0,269	0,234	0,035	1,026	0,967	0,059	1,753	1,723	0,030	2,205	2,148	0,057	2,530	2,467	0,063	2,536	2,590	0,000
2	0,051	0,057	0,053	0,004	0,060	0,059	0,001	0,080	0,079	0,001	0,211	0,203	0,008	0,700	0,669	0,031	1,387	1,332	0,055	1,996	1,922	0,074	2,288	2,301	0,000
4	0,055	0,057	0,053	0,004	0,058	0,057	0,001	0,067	0,066	0,001	0,098	0,088	0,010	0,204	0,185	0,019	0,277	0,269	0,008	1,094	1,028	0,066	1,713	1,694	0,019
6	0,075	0,084	0,053	0,031	0,063	0,062	0,001	0,066	0,065	0,001	0,076	0,070	0,006	0,105	0,095	0,010	0,204	0,196	0,008	0,350	0,295	0,055	0,320	0,300	0,020
8	0,137	0,158	0,052	0,106	0,079	0,062	0,017	0,069	0,067	0,002	0,075	0,068	0,007	0,088	0,082	0,006	0,113	0,112	0,001	0,161	0,144	0,017	0,206	0,203	0,003
10	0,180	0,223	0,054	0,169	0,138	0,062	0,076	0,074	0,068	0,006	0,074	0,068	0,006	0,084	0,079	0,005	0,103	0,102	0,001	0,126	0,118	0,008	0,148	0,144	0,004
12	0,213	0,271	0,057	0,214	0,177	0,062	0,115	0,083	0,068	0,015	0,073	0,069	0,004	0,082	0,077	0,005	0,100	0,099	0,001	0,120	0,110	0,010	0,126	0,124	0,002
18	0,473	0,345	0,053	0,292	0,321	0,062	0,259	0,272	0,056	0,216	0,187	0,058	0,129	0,065	0,062	0,003	0,066	0,066	0,000	0,070	0,070	0,000	0,060	0,065	0,000
20	0,505	0,361	0,054	0,307	0,354	0,062	0,292	0,293	0,056	0,237	0,215	0,059	0,156	0,069	0,063	0,006	0,065	0,066	0,000	0,068	0,068	0,000	0,059	0,063	0,000
22	0,532	0,400	0,056	0,344	0,410	0,062	0,356	0,353	0,058	0,295	0,278	0,060	0,218	0,160	0,063	0,097	0,066	0,067	0,000	0,065	0,067	0,000	0,058	0,061	0,000
24	0,560	0,439	0,058	0,381	0,418	0,062	0,405	0,382	0,062	0,320	0,330	0,062	0,268	0,252	0,064	0,188	0,081	0,068	0,013	0,067	0,068	0,000	0,061	0,061	0,000

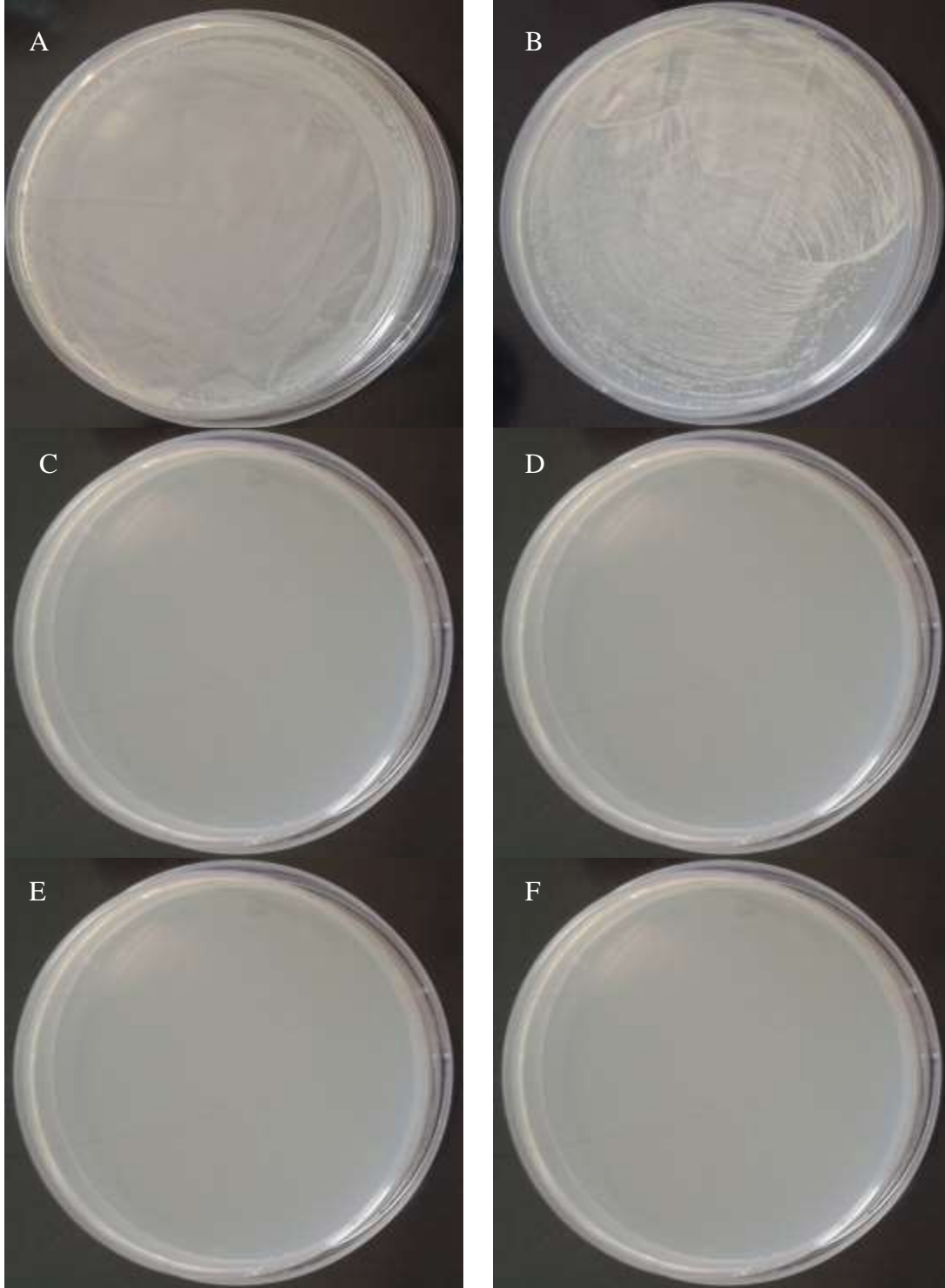
Çizelge A.7 : Kakule esansiyel yağının *S. aureus* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark	0,46	Negatif kontrol	Fark	0,93	Negatif kontrol	Fark	1,87	Negatif kontrol	Fark	3,75	Negatif kontrol	Fark	7,5	Negatif kontrol	Fark	15	Negatif kontrol	Fark	30	Negatif kontrol	Fark
0	0,051	0,057	0,054	0,003	0,106	0,091	0,015	0,243	0,231	0,012	0,482	0,351	0,131	1,294	1,135	0,159	1,782	1,780	0,002	2,121	2,102	0,019	2,355	2,137	0,218
2	0,051	0,059	0,053	0,006	0,067	0,062	0,005	0,169	0,079	0,090	0,283	0,202	0,081	0,573	0,534	0,039	0,990	1,199	0,000	1,673	1,638	0,035	1,914	1,902	0,012
4	0,055	0,061	0,054	0,007	0,064	0,061	0,003	0,122	0,071	0,051	0,185	0,088	0,097	0,235	0,214	0,021	0,232	0,597	0,000	1,053	1,019	0,034	1,466	1,467	0,000
6	0,075	0,094	0,055	0,039	0,082	0,061	0,021	0,094	0,070	0,024	0,138	0,078	0,060	0,108	0,107	0,001	0,267	0,275	0,000	0,353	0,300	0,053	0,625	0,635	0,000
8	0,137	0,147	0,058	0,089	0,148	0,061	0,087	0,102	0,068	0,034	0,111	0,075	0,036	0,097	0,092	0,005	0,143	0,146	0,000	0,274	0,273	0,001	0,232	0,275	0,000
10	0,180	0,237	0,060	0,177	0,229	0,061	0,168	0,134	0,069	0,065	0,118	0,074	0,044	0,093	0,091	0,002	0,122	0,124	0,000	0,160	0,181	0,000	0,243	0,248	0,000
12	0,213	0,278	0,061	0,217	0,279	0,063	0,216	0,161	0,069	0,092	0,139	0,075	0,064	0,098	0,081	0,017	0,115	0,118	0,000	0,137	0,154	0,000	0,190	0,192	0,000
18	0,473	0,359	0,052	0,307	0,353	0,063	0,290	0,331	0,069	0,262	0,327	0,060	0,267	0,258	0,064	0,194	0,207	0,074	0,133	0,091	0,083	0,008	0,084	0,092	0,000
20	0,505	0,378	0,054	0,324	0,384	0,061	0,323	0,359	0,070	0,289	0,354	0,061	0,293	0,287	0,066	0,221	0,231	0,075	0,156	0,099	0,089	0,010	0,088	0,094	0,000
22	0,532	0,417	0,058	0,359	0,415	0,060	0,355	0,395	0,070	0,325	0,388	0,061	0,327	0,327	0,067	0,260	0,267	0,076	0,191	0,101	0,097	0,004	0,088	0,094	0,000
24	0,560	0,527	0,063	0,464	0,468	0,061	0,407	0,429	0,070	0,359	0,406	0,063	0,343	0,357	0,066	0,291	0,308	0,076	0,232	0,113	0,102	0,011	0,088	0,093	0,000

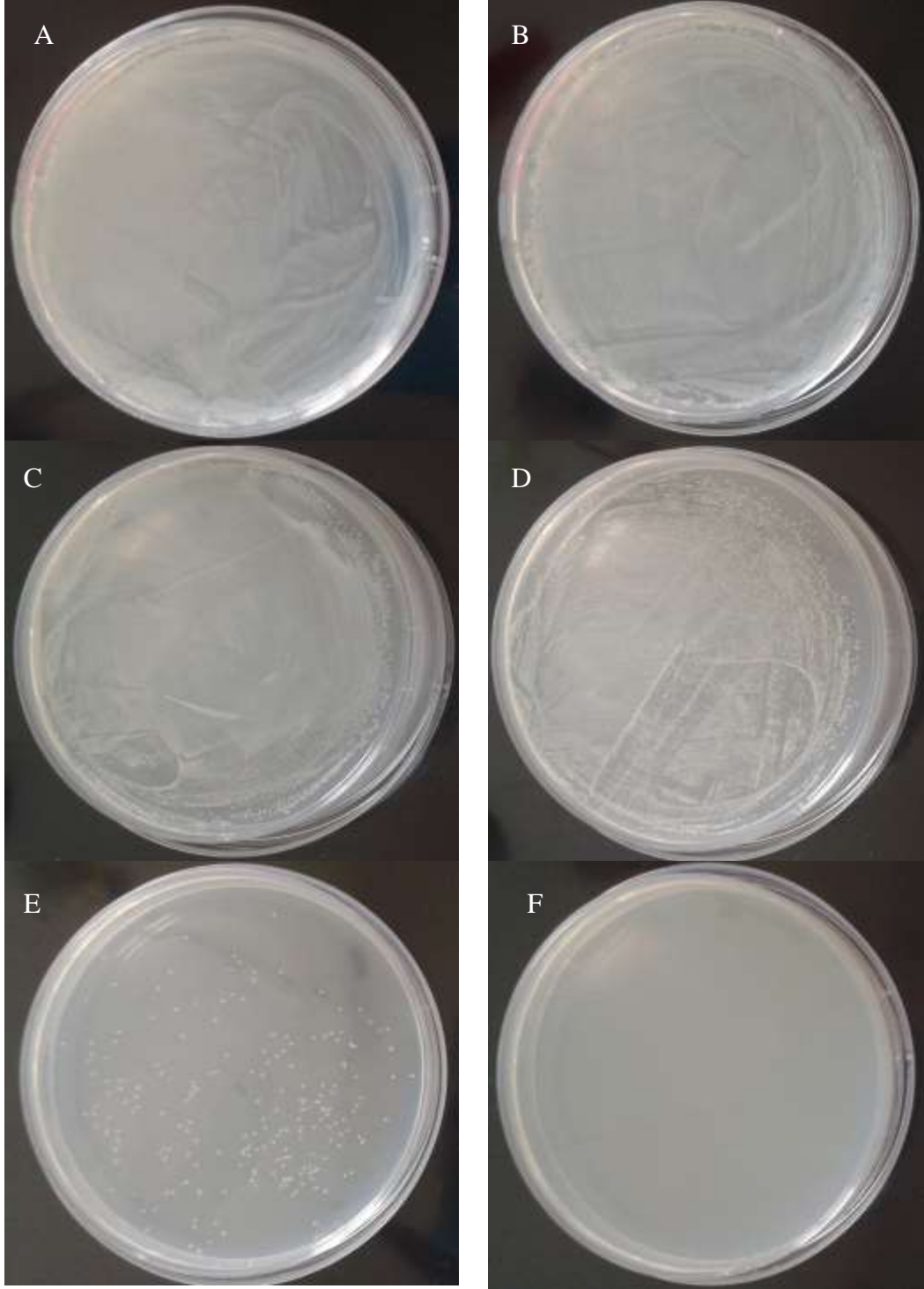
Çizelge A.8 : Mercanköşk esansiyel yağının *S. aureus* üzerine etkisi ile belirlenen optik yoğunluklar.

Saat	Pozitif kontrol	0,23	Negatif kontrol	Fark 0,46	Negatif kontrol	Fark 0,93	Negatif kontrol	Fark 1,87	Negatif kontrol	Fark 3,75	Negatif kontrol	Fark 7,5	Negatif kontrol	Fark 15	Negatif kontrol	Fark 30	Negatif kontrol	Fark							
0	0,051	0,052	0,050	0,002	0,053	0,052	0,001	0,072	0,070	0,002	0,106	0,102	0,004	0,242	0,240	0,002	0,604	0,576	0,028	1,116	1,051	0,065	1,650	1,519	0,131
2	0,051	0,052	0,049	0,003	0,053	0,053	0,000	0,068	0,075	0,000	0,093	0,104	0,000	0,164	0,193	0,000	0,360	0,585	0,000	0,634	0,656	0,000	0,657	0,932	0,000
4	0,055	0,054	0,051	0,003	0,055	0,055	0,000	0,067	0,075	0,000	0,087	0,104	0,000	0,147	0,185	0,000	0,304	0,403	0,000	0,447	0,587	0,000	0,702	0,734	0,000
6	0,075	0,066	0,051	0,015	0,055	0,055	0,000	0,066	0,074	0,000	0,084	0,103	0,000	0,139	0,162	0,000	0,246	0,340	0,000	0,349	0,452	0,000	0,629	0,792	0,000
8	0,137	0,116	0,054	0,062	0,064	0,060	0,004	0,066	0,073	0,000	0,085	0,098	0,000	0,138	0,160	0,000	0,215	0,303	0,000	0,314	0,427	0,000	0,549	0,904	0,000
10	0,180	0,181	0,054	0,127	0,076	0,064	0,012	0,070	0,075	0,000	0,086	0,098	0,000	0,135	0,150	0,000	0,206	0,294	0,000	0,289	0,386	0,000	0,510	0,802	0,000
12	0,213	0,229	0,054	0,175	0,087	0,066	0,021	0,074	0,075	0,000	0,083	0,100	0,000	0,135	0,151	0,000	0,204	0,264	0,000	0,277	0,309	0,000	0,497	0,661	0,000
18	0,473	0,411	0,055	0,356	0,312	0,066	0,246	0,057	0,057	0,000	0,061	0,064	0,000	0,095	0,101	0,000	0,156	0,169	0,000	0,225	0,262	0,000	0,459	0,471	0,000
20	0,505	0,440	0,054	0,386	0,354	0,068	0,286	0,061	0,061	0,000	0,061	0,067	0,000	0,105	0,107	0,000	0,162	0,176	0,000	0,253	0,258	0,000	0,507	0,529	0,000
22	0,532	0,470	0,058	0,412	0,377	0,064	0,313	0,069	0,068	0,001	0,062	0,067	0,000	0,108	0,109	0,000	0,169	0,177	0,000	0,240	0,242	0,000	0,500	0,515	0,000
24	0,560	0,488	0,060	0,428	0,382	0,064	0,318	0,072	0,065	0,007	0,070	0,070	0,000	0,105	0,109	0,000	0,144	0,176	0,000	0,172	0,219	0,000	0,438	0,532	0,000

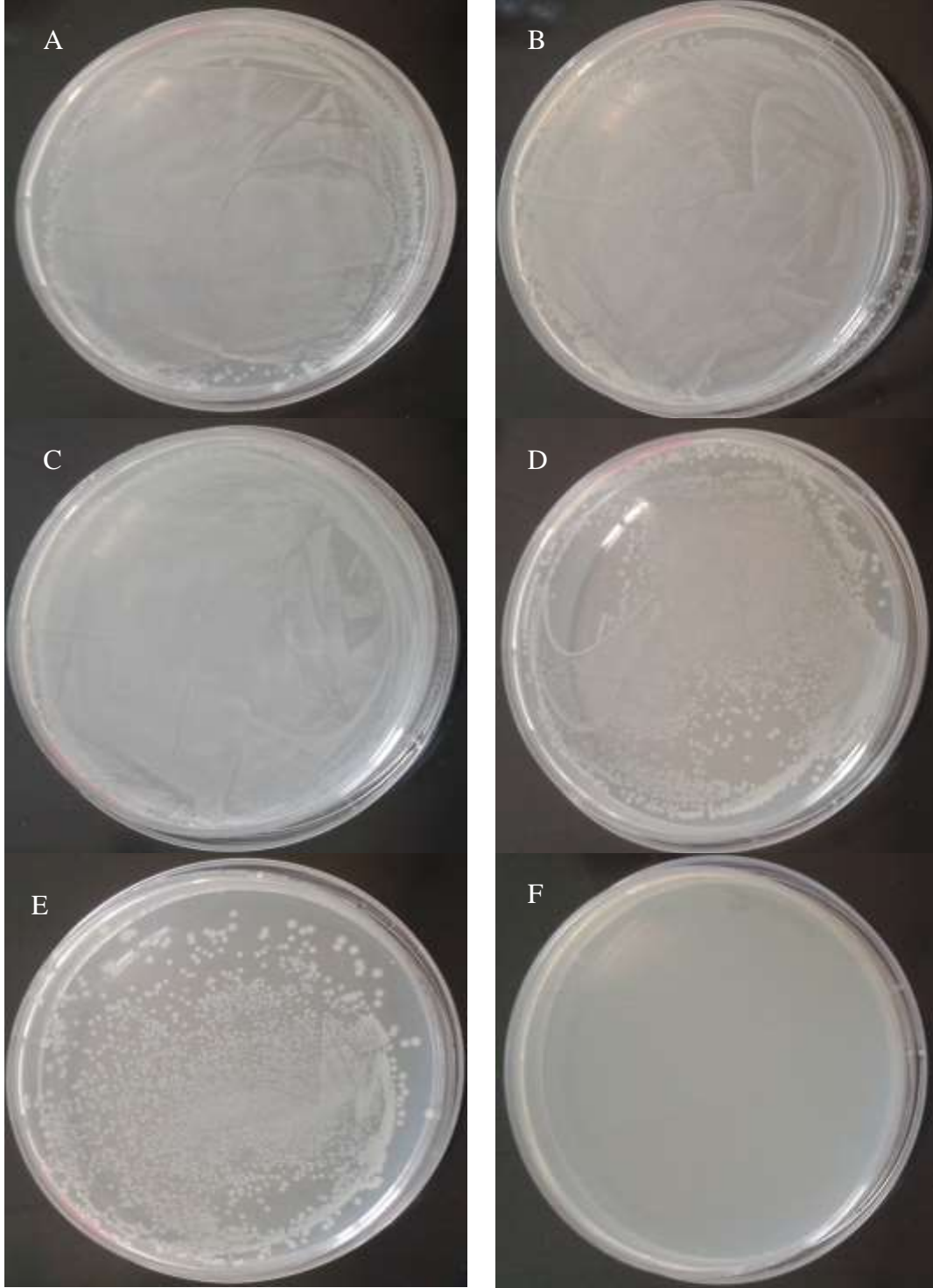
EK B : Kekik, kimyon, kakule, mercanköşk esansiyel yağlarının *E. coli* ve *S. aureus* için MBK değerlerinin belirlenmesi.



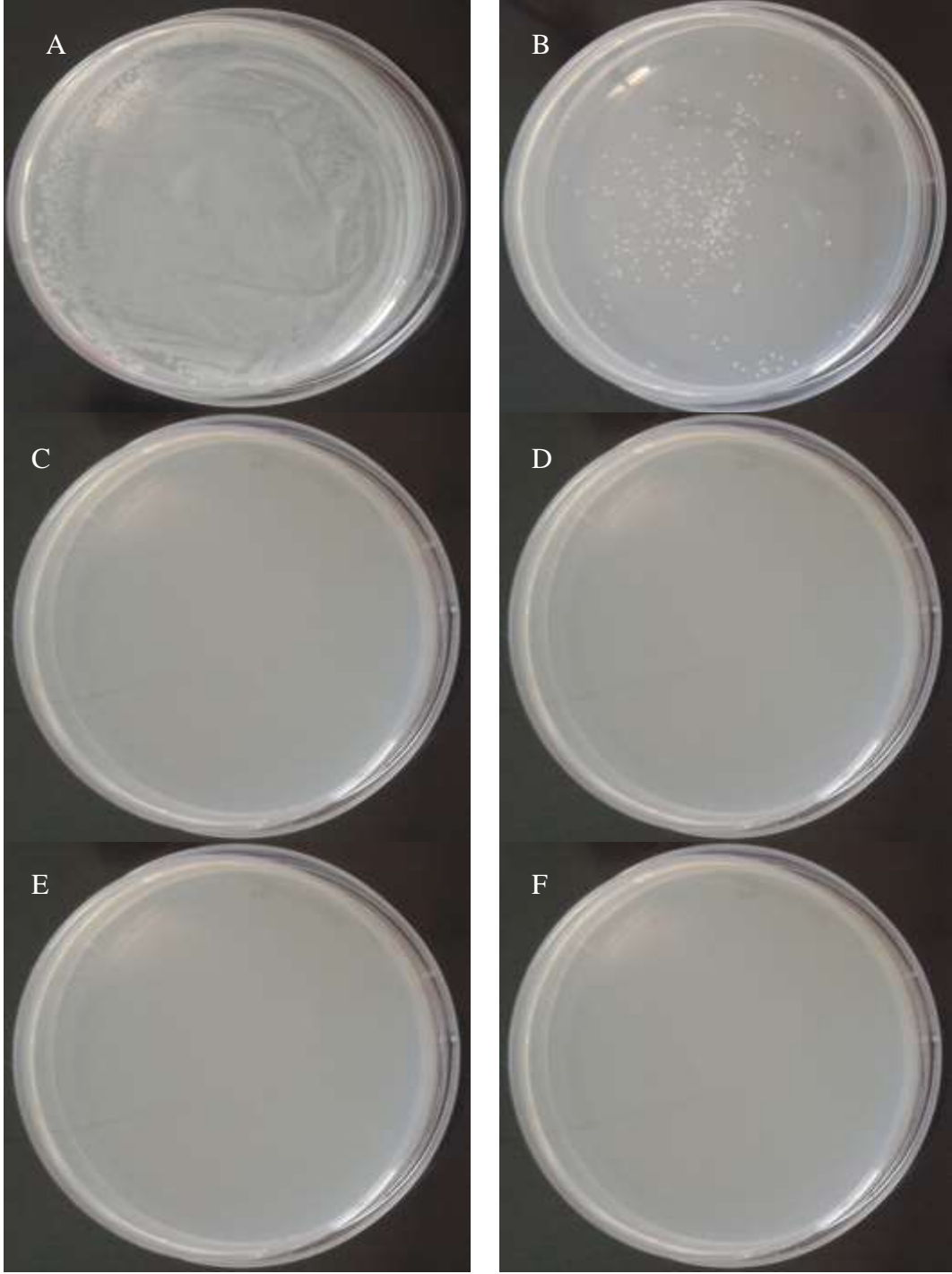
Şekil B.1 : Kekik esansiyel yağının *E. coli* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (B) 0,46 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (C) 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (D) 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (E) 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (F) 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu.



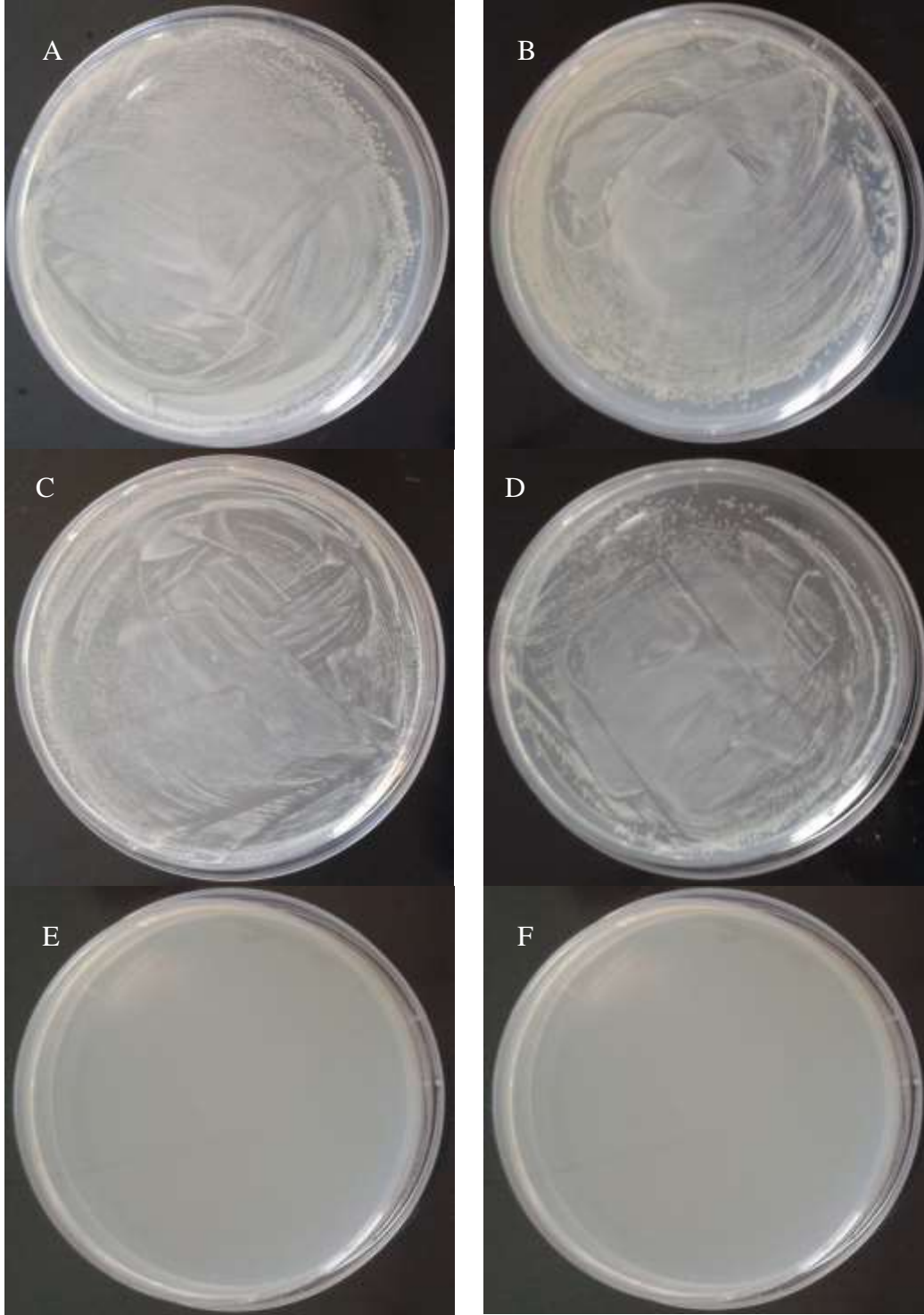
Şekil B.2 : Kimyon esansiyel yağının *E. coli* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (B) 0,46 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (C) 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (D) 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (E) 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (F) 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu.



Şekil B.3 : Kakule esansiyel yağının *E. coli* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (B) 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (C) 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (D) 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (E) 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (F) 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu.



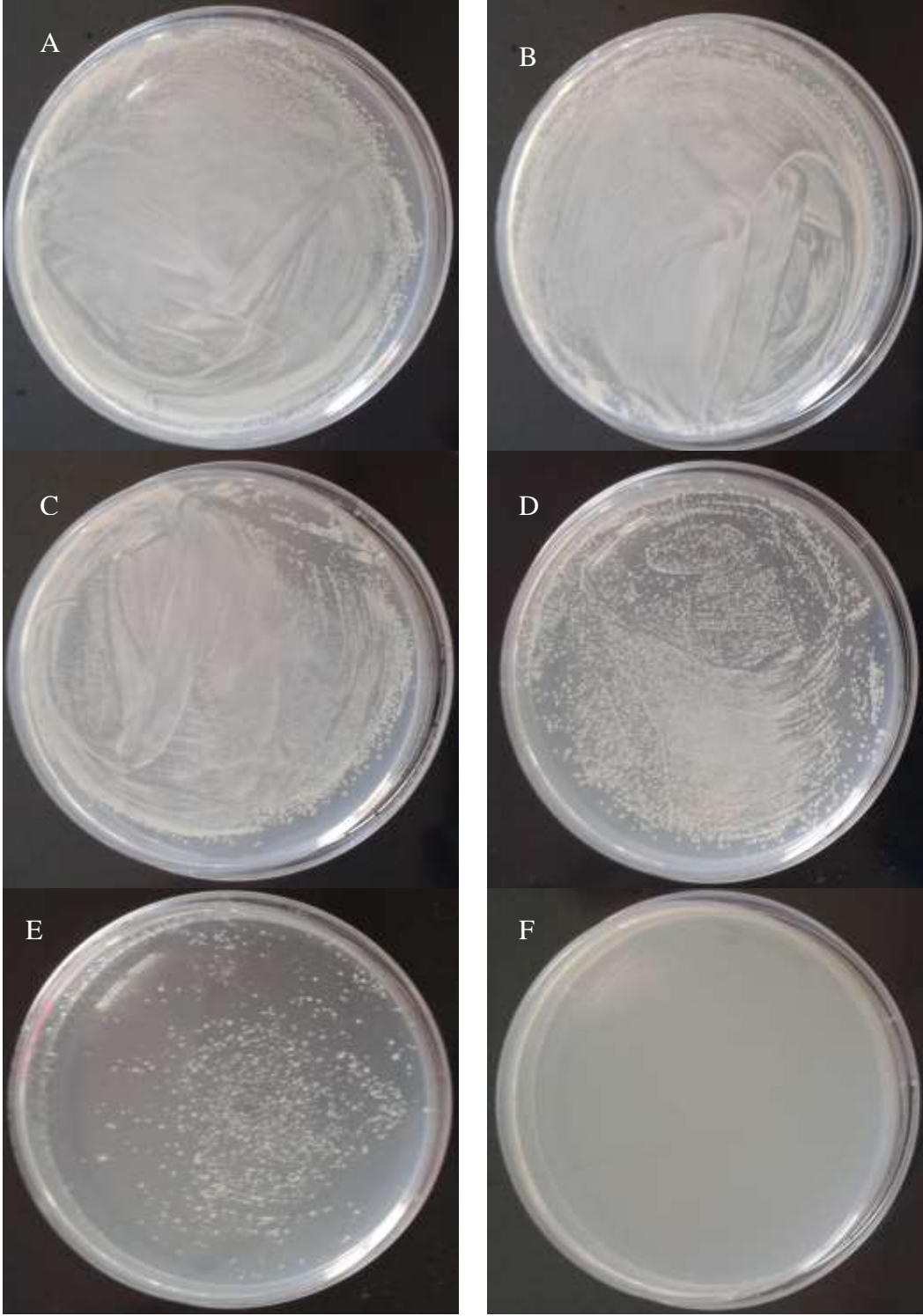
Şekil B.4 : Mercanköşk esansiyel yağının *E. coli* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (B) 0,46 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (C) 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (D) 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (E) 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (F) 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu.



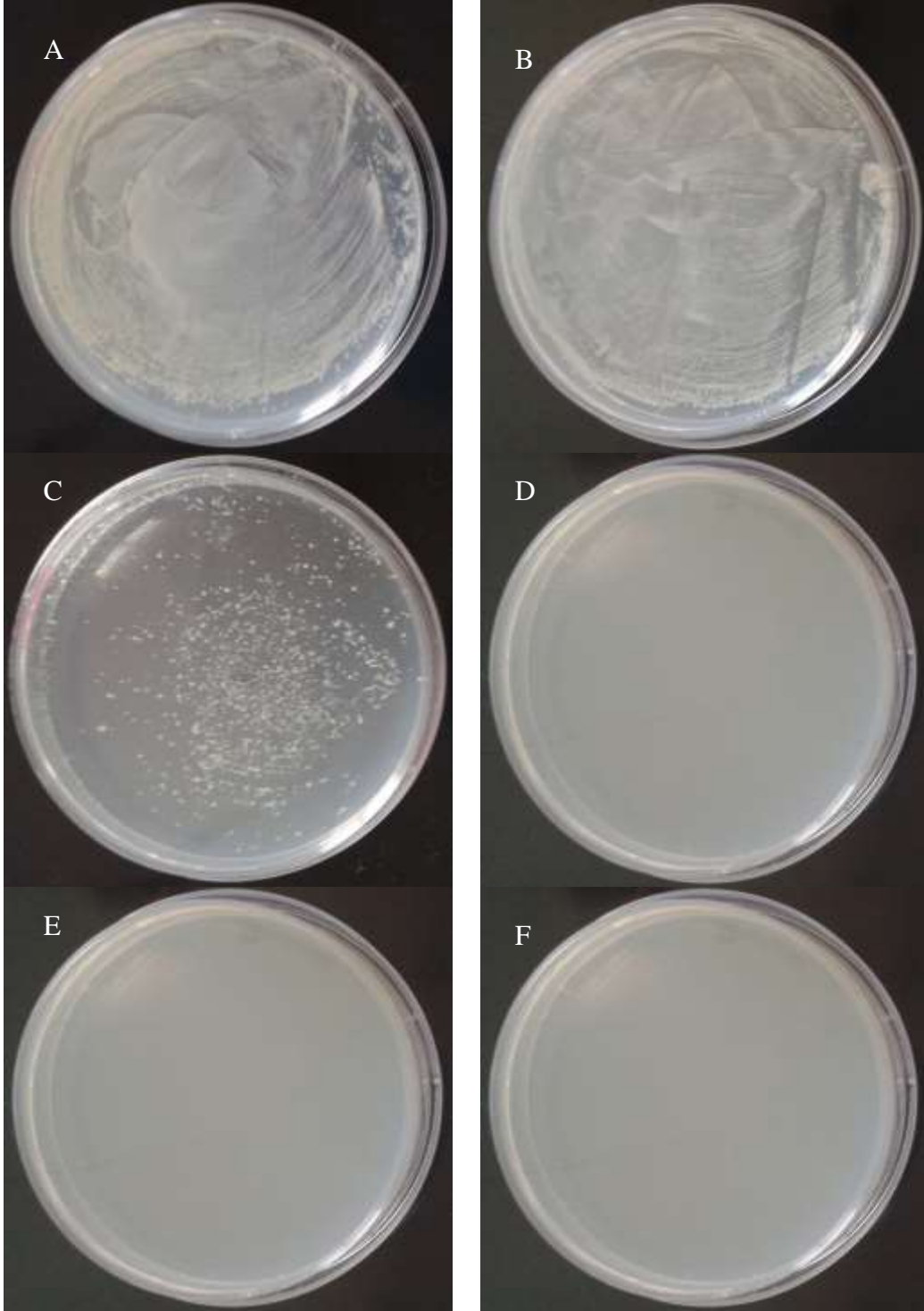
Şekil B.5 : Kekik esansiyel yağının *S. aureus* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (B) 0,46 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (C) 0,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (D) 1,87 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (E) 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu, (F) 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ yağ konsantrasyonu.



Şekil B.6 : Kimyon esansiyel yağının *S. aureus* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,93 µL/mL yağ konsantrasyonu, (B) 1,87 µL/mL yağ konsantrasyonu, (C) 3,75 µL/mL yağ konsantrasyonu, (D) 7,5 µL/mL yağ konsantrasyonu, (E) 15 µL/mL yağ konsantrasyonu, (F) 30 µL/mL yağ konsantrasyonu.



Şekil B.7 : Kakule esansiyel yağının *S. aureus* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,93 µL/mL yağ konsantrasyonu, (B) 1,87 µL/mL yağ konsantrasyonu, (C) 3,75 µL/mL yağ konsantrasyonu, (D) 7,5 µL/mL yağ konsantrasyonu, (E) 15 µL/mL yağ konsantrasyonu, (F) 30 µL/mL yağ konsantrasyonu.



Şekil B.8 : Mercanköşk esansiyel yağının *S. aureus* için MBK değerinin belirlenmesi (A) 0,23 µL/mL yağ konsantrasyonu, (B) 0,46 µL/mL yağ konsantrasyonu, (C) 0,93 µL/mL yağ konsantrasyonu, (D) 1,87 µL/mL yağ konsantrasyonu, (E) 3,75 µL/mL yağ konsantrasyonu, (F) 7,5 µL/mL yağ konsantrasyonu.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Duygu Turhan
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul/1989
E-Posta : turhan.duygu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2012, Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

MESLEKİ DENEYİM:

- 2010 Kervan Süt Ürünleri Gıda San. ve Tic.Ltd.Şti - Üretim Stajı
- 2010 Beyazpınar Şekerleme Gıda San. Tic. A.Ş. - Üretim Stajı
- 2011 Besler Gıda ve Kimya Sanayii ve Ticaret A.Ş. - Laboratuar Stajı
- 2012-2013 Çelikler Un Mamulleri Gıda Mad. İmalat Dağ. Paz. San. Tic. Ltd Şti- Üretim Mühendisi