



***Escherichia coli* O157:H7 ELİMİNASYONU İÇİN DOĞAL  
ANTİMİKROBİYAL BİLEŞENLERİN VE  
BAKTERİYOFAJLARIN KULLANIMI**

**USE OF NATURAL ANTIMICROBIAL COMPONENTS AND  
BACTERİOPAHGES FOR ELIMINATION OF *Escherichia  
coli* O157:H7**

**Şefika EVRAN**

**Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI**

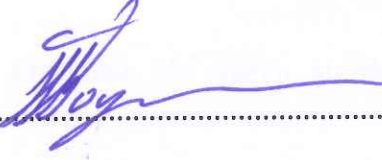
**Tez danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

Şefika EVRAN'ın hazırladığı "Escherichia coli O157:H7 Eliminasyonu için Doğal Antimikrobiyal Bileşenlerin ve Bakteriyofajların Kullanımı" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI  
Başkan



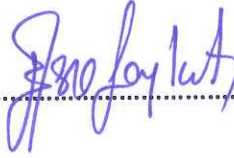
Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN  
Üye



Doç. Dr. H. Murat VELİOĞLU  
Üye



Doç. Dr. Esra Acar SOYKUT  
Üye



Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda DUDAK ŞEKER  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

18.../07/2019

Şefika EVRAN

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi/H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.

Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.

Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

.18..107./2019.



Şefika EVRAN

*Sevgili annem Halime EVRAN'a...*

## ÖZET

# ***Escherichia coli* O157:H7 ELİMİNASYONU İÇİN DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİLEŞENLERİN VE BAKTERİYOFAJLARIN KULLANIMI**

**Şefika EVRAN**

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI**

**Haziran 2019, 106 sayfa**

Son yıllarda gelişen antibiyotik direnci ile birlikte patojen bakterilerin kontrolünde zorluklar yaşanmaya başlamıştır. Bu nedenle patojen bakterilerle mücadele kapsamında yeni yöntemlerin araştırılması gerekmektedir. *E. coli* O157:H7 bakterisi insanlar için önemli bir patojendir. Sunulan tez kapsamında *E. coli* O157:H7 bakterisinin inhibisyonu için doğal antimikrobiyal bileşenlerin ve bakteriyofajların kullanımı ayrıca bu bileşenlerle bakteriyofajların birlikte kullanımının *E. coli* O157:H7 bakterisi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Öncelikle *E. coli* O157:H7 bakterisine ait fajlar izole edilmiştir. Üzüm, ayva, nar gibi bitkisel ürünlerden fenolik madde ekstraksiyonu yapılmış ve *E. coli* O157:H7 üzerindeki antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Ayrıca beş farklı pekmez örneği ve propolisin de



*E. coli* O157:H7 üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Antibakteriyal etki hem katı hem de sıvı ortamda incelenmiştir. Bitkisel ekstraktların ve propolisin toplam fenolik içeriklerine bakılmış, pekmez örneklerinin ise hem toplam fenolik hem de hidroksimetil furfural (HMF) miktarları belirlenmiştir. Örneklerin karakteristik bazı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla HMF ve toplam fenolik madde değerleri saptanmıştır. Daha sonra *E. coli* O157:H7 inhibisyonu için bitkisel ekstraktlar, pekmez örnekleri ve propolisin fajlarla birlikte kullanımı araştırılmıştır. Genel olarak pekmez örneklerinin orijinal konsantrasyonu olan d ile d/2 ve d/4 konsantrasyonları faj plaklarının büyümesine neden olurken d/16 konsantrasyonu plak büyüklüğü üzerine etki etmemiştir. Üzüm, ayva ve nar ekstraktlarının yüksek konsantrasyonları faj oluşumunu inhibe ederken düşük konsantrasyonların faj plak büyüklüğü üzerine bir etki yapmadığı gözlenmiştir. Propolis örneğinde faj titresinin azalttığı gözlenmiştir. Plak büyüklüğü üzerine en iyi etki pekmez örneğinde görüldüğü için faj-pekmez arasındaki etkileşimin araştırılması için sıvı ortam denemelerine geçilmiştir. Bu denemeler için keçiboynuzu pekmezi örneği ve tp3 fajı seçilmiştir. Yalnızca fajın ve faj-pekmez kullanımının *E. coli* O157:H7 inhibisyonuna ve faj titresine olan etkisinin anlaşılabilmesi için zaman-ölüm eğrisi deneyi yapılmıştır. Pekmez örneğinin faj patlama büyüklüğüne olan etkisinin anlaşılabilmesi için tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmıştır. Gelişme eğrisi sonuçlarına göre pekmezin faj patlama büyüklüğünü arttırdığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar fajın tek başına daha iyi çalıştığını ve pekmezin faj üzerinde kısmen antiviral etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Pekmezin faj üzerindeki etkisinin daha iyi ortaya konması amacıyla faj duyarlılık testi yapılmış ve pekmez varlığının faj titresini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Faj ile pekmez arasında tam bir sinerjistik etki gözlenememiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyofaj, Faj Terapi, Sinerjizm, *Escherichia coli* O157:H7, Antimikrobiyal Bileşenler

## **ABSTRACT**

# **USE OF NATURAL ANTIMICROBIAL COMPONENTS AND BACTERIOPHAGES FOR ELIMINATION OF *Escherichia coli* O157:H7**

**Şefika EVRAN**

**Master of Science, Food Engineering Department**

**Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI**

**June 2019, 106 pages**

In recent years, with the development of antibiotic resistance, difficulties have been experienced in the control of pathogenic bacteria. Therefore, new methods need to be examined in the context of the fight against pathogenic bacteria. *E. coli* O157: H7 is an significant pathogen for humans. In this thesis, the use of natural antimicrobial components and bacteriophages for inhibition of *E. coli* O157: H7 bacteria and the effect of the combination of these components and bacteriophages on *E. coli* O157: H7 bacteria were investigated. Phages of *E. coli* O157: H7 were first isolated. Phenolic extracts were extracted from vegetable products such as grapes, quince and pomegranate and its antibacterial effect on *E. coli* O157: H7 was investigated. In addition, antimicrobial effect of five different molasses samples and propolis on *E. coli* O157: H7 were investigated.

Antibacterial effect was investigated in both solid and liquid medium. The total phenolic contents of plant extracts and propolis were analyzed, and the total phenolic and hydroxymethyl furfural (HMF) amounts of molasses were determined. HMF and total phenolic values were determined in order to determine some characteristics of the samples. Subsequently, plant extracts, molasses samples and the use of propolis with phages were investigated for inhibition of *E. coli* O157: H7. In general, the original concentration of molasses samples d and d/2 and d/4 concentrations led to growth of phage plaques, while d/16 concentration did not affect plaque size. High concentrations of grape, quince and pomegranate extracts inhibited phage formation, while low concentrations did not affect phage plaque size. It was observed that the phage titer decreased in the propolis sample. Since the best effect on plaque size was seen in molasses, liquid medium experiments were started to investigate the interaction between phage and molasses. Carob molasses sample and tp3 phage were selected for these experiments. Time-death curve test was performed to understand the effect of phage and phage-molasses only on *E. coli* O157: H7 inhibition and phage titer. In order to understand the effect of the molasses sample on the phage burst size, a one-stage growth curve was obtained. According to the growth curve results, it was observed that molasses increased phage burst size. The results showed that phage alone worked better and that molasses partially had antiviral effect on phage. Phage susceptibility test was performed to determine the effect of molasses on phage and it was observed that the presence of molasses decreased the phage titer. No complete synergistic effect was observed between phage and molasses.

**Keywords:** Bacteriophage, Phage Therapy, Synergism, *Escherichia coli* O157: H7, Antimicrobial Components

## TEŞEKKÜR

Bilgisi ve tecrübesiyle her aşamada yanımda olan, değerli tez danışmanım Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Tez çalışmamın tüm aŐamalarında bana bilgisi ile yol gÖsteren sevgili hocalarım Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT ve Dr. Burcu GÜVEN'e,

Tezin tüm deneysel aŐamalarındaki yardımları, arkadaşlığı ve dostluğuyla her zaman yanımda olan Yük. Gıda Müh. Emine Kübra TAYYARCAN'a,

Tüm destekleri için Yük. Gıda Müh. Banu SEZER'e, Yük. Gıda Müh. Elif ERCİOğLU'na, Gıda Müh. Zeyneb GÜNEYSU'ya, ArŐ. Gör. Tümay TEMİZ'e, Gıda Müh. Nurdan ERSÖZ'e ve Güverta Lab. Grubunun tamamına,

Sevgileriyle her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Halime EVRAN'a, babam Hasan EVRAN'a ve kardeŐim Esra EVRAN'a,

teŐekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Patojen Bakteriler.....	4
2.1.1. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler, Bulaşı Yolları, Neden Olduğu Hastalıklar.....	4
2.1.2. Patojen Bakterilerin Kontrolü.....	5
2.1.3. Patojen Bakterilerdeki Antibiyotik Direnci.....	9
2.2. Fajlar.....	12
2.2.1. Fajların Keşfi, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları.....	12
2.2.2. Faj Terapinin Tarihi ve Kullanım Alanları.....	15
2.2.3. Gıdalarda Faj Kullanımı.....	17
2.2.4. Faj ve Sinerjizm Çalışmaları.....	20
2.2.5. Faj Terapinin Avantajları ve Dezavantajları.....	22
2.3. Antimikrobiale Maddeler.....	23
2.3.1. Doğal Bitki Ekstraktları.....	23
2.3.2. Pekmez.....	26
2.3.3. Propolis.....	27
3. MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Materyal.....	30

3.1.1. Bakteri ve Faj.....	30
3.1.2. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler .....	30
3.1.3. Fenolik Bileşikler ve Pekmez Örnekleri .....	30
3.2. Metot.....	31
3.2.1. Faj İzolasyonu, Safılaştırma ve Zenginleştirme .....	31
3.2.1.1. Faj İzolasyonu .....	31
3.2.1.2. Fajın Safılaştırılması.....	31
3.2.2. Doğal Bitki Ekstraktları.....	32
3.2.2.1. Fenolik Madde Ekstraksiyonu.....	32
3.2.2.2. Doğal Bitki Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi .....	33
3.2.3. Pekmez Örneklerinin Analizleri.....	33
3.2.3.1. HMF Miktarının Belirlenmesi .....	33
3.2.3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	33
3.2.4. Propolis.....	34
3.2.4.1. Propolis Ekstraksiyonu .....	34
3.2.4.2. Propolis Örneğinden Fenolik Ekstraksiyonu .....	34
3.2.4.3. Propolisin Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	35
3.2.5. Doğal Bitki Ekstraktlarının, Pekmez Örneklerinin ve Propolisin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi.....	35
3.2.6. Bitki Ekstraktları, Pekmez Örnekleri ve Propolisin Faj Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi .....	36
3.2.7. Faj ile Pekmez Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi.....	37
3.2.7.1. Faj-Pekmez Etkileşiminin Sıvı Ortamda İncelenmesi .....	37
3.2.7.2. Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi .....	37
3.2.7.3. Faj Duyarlılığının Belirlenmesi .....	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	39

4.1. Faj İzolasyonu .....	39
4.2. Fenolik Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi .....	39
4.3. Pekmez Örneklerinde HMF, Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi .....	40
4.4. Propolis Örneklerinin Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi .....	43
4.5. Fenolik Örneklerinin Antimikrobiyal Etkisini Belirlenmesi .....	44
4.6. Pekmez Örneklerinin Antimikrobiyal Etkisini Belirlenmesi .....	45
4.7. Propolis Örneklerinin Antimikrobiyal Etkisini Belirlenmesi .....	47
4.8. Doğal Bitki Ekstraktlarının Faj Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi .....	48
4.9. Propolis Örneğinin Fajlara ve Faj Plak Büyüklüğüne Olan Etkisi .....	50
4.10. Faj ile Pekmez Örnekleri Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi .....	51
4.10.1. Pekmez Örneklerinin Faj Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi .....	51
4.10.2. Faj-Pekmez Arasındaki Etkileşimin Sıvı Ortamda İncelenmesi .....	59
4.10.3. Tek aşamalı Gelişme Eğrisinin Çıkarılması .....	63
4.10.4. Faj Duyarlılığı .....	65
5. SONUÇ VE YORUM .....	66
KAYNAKLAR .....	69
ÖZGEÇMİŞ .....	84

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1.</b> Gıdalardan izole edilen antibiyotik dirençli bakteriler .....	10
<b>Çizelge 2.2.</b> Bradley tarafından nükleik asit çeşitine ve morfolojik özelliklere göre yapılan faj sınıflandırılması .....	14
<b>Çizelge 2.3.</b> Taze gıdaların faj ile biyokontrolü ile ilgili çalışmalar .....	19
<b>Çizelge 4.1.</b> İzole edilen E. coli O157:H7 fajları .....	39
<b>Çizelge 4.2.</b> Doğal bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri.....	40
<b>Çizelge 4.3.</b> Pekmez örneklerine ait toplam fenolik (TP) ve hidroksimetilfurfural (HMF) değerleri.....	43
<b>Çizelge 4.4.</b> Bitki ekstraktlarının MIC ve MBC değerleri .....	44
<b>Çizelge 4.5.</b> Pekmez örneklerinin MIC ve MBC değerleri .....	47
<b>Çizelge 4.6.</b> Bitki ekstraktlarının faj plak büyüklüklerine olan etkisi .....	49
<b>Çizelge 4.7.</b> Propolis örneklerinin fajlara olan etkisi .....	50
<b>Çizelge 4.8.</b> Pekmez örneklerinin E. coli O157:H7 fajlarının plak büyüklüklerine olan etkisi .....	52
<b>Çizelge 4.9.</b> Farklı konsantrasyonlardaki pekmez örneklerinin tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi .....	58
<b>Çizelge 4.10.</b> T pekmez örneğinin tp3 fajına olan etkisi.....	65



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 2.1.</b> Flavonoidlerin temel sınıflarının kimyasal yapıları.....	24
<b>Şekil 2.2.</b> Benzoik asit ve Sinamik asitin kimyasak yapıları .....	25
<b>Şekil 2.3.</b> HMF'nin molekül yapısı.....	27
<b>Şekil 4.1.</b> Gallik asitin kalibrasyon grafiği .....	41
<b>Şekil 4.2.</b> Farklı pekmez örneklerinin <i>E. coli</i> O57:H7 üzerine etkisi.....	46
a) T, b) KD, c) KBM, d) UP, e) DP .....	46
<b>Şekil 4.3.</b> Nar ekstraktının tp5 fajının plaklarına olan etkisi.....	49
a) d konsantrasyonu; b) d/2 konsantrasyonu; c) d/4 konsantrasyonu.....	49
<b>Şekil 4.4.</b> KBM pekmez örneğinin <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi .....	54
a) d/2,10 <sup>-5</sup> ; b) d/2, 10 <sup>-6</sup> ; c) d/4, 10 <sup>-5</sup> ; d) d/4, 10 <sup>-6</sup> ; e) d/8, 10 <sup>-5</sup> ; f) d/8, 10 <sup>-6</sup> .....	54
<b>Şekil 4.5.</b> T pekmez örneğinin <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi .....	54
a) d/2,10 <sup>-5</sup> ; b) d/2, 10 <sup>-6</sup> ; c) d/8, 10 <sup>-5</sup> ; d) d/8, 10 <sup>-6</sup> ; e) d/16, 10 <sup>-5</sup> ; f) d/16, 10 <sup>-6</sup> .....	54
<b>Şekil 4.6.</b> KD pekmez örneğinin <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi .....	55
a) d/2,10 <sup>-5</sup> ; b) d/2, 10 <sup>-6</sup> ; c) d/4, 10 <sup>-5</sup> ; d) d/4, 10 <sup>-6</sup> ; e) d/8, 10 <sup>-5</sup> ; f) d/8, 10 <sup>-6</sup> ; g) d/16, 10 <sup>-5</sup> ; h) d/16, 10 <sup>-6</sup> .....	55
<b>Şekil 4.7.</b> DP pekmez örneğinin <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi .....	56
a) d/2,10 <sup>-5</sup> ; b) d/2, 10 <sup>-6</sup> ; c) d/4, 10 <sup>-5</sup> ; d) d/4, 10 <sup>-6</sup> ; e) d/8, 10 <sup>-5</sup> ; f) d/8, 10 <sup>-6</sup> ; g) d/16, 10 <sup>-5</sup> ; h) d/16, 10 <sup>-6</sup> .....	56
<b>Şekil 4.8.</b> ÜP pekmez örneğinin <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi .....	57
a) d/2, 10 <sup>-5</sup> ; b) d/2, 10 <sup>-6</sup> ; c) d/4, 10 <sup>-5</sup> ; d) d/4, 10 <sup>-6</sup> ; e) d/8, 10 <sup>-5</sup> ; f) d/8, 10 <sup>-6</sup> ; g) d/16, 10 <sup>-5</sup> ; h) d/16, 10 <sup>-6</sup> .....	57

<b>Şekil 4.9.</b> d/4 konsantrasyonunda pekmez varlığında zaman-ölüm eğrisi.....	60
<b>Şekil 4.10.</b> d/8 konsantrasyonunda pekmez varlığında zaman-ölüm eğrisi.....	61
<b>Şekil 4.11.</b> d/4 konsantrasyonunda pekmez varlığında faj titresinin değişimi.....	62
<b>Şekil 4.12.</b> d/8 konsantrasyonunda pekmez varlığında faj titresindeki değişim.....	62
<b>Şekil 4.13.</b> Pekmez bulunan ve bulunmayan ortamda <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının gelişme eğrisindeki değişim.....	63
<b>Şekil 4.14.</b> Pekmez bulunan ve bulunmayan ortamda <i>E. coli</i> O157:H7 tp3 fajının gelişme eğrisindeki değişim.....	64

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

- $A_w$  : Su aktivitesi  
 $R^2$  : Belirleme katsayısı

### Kısaltmalar

- CDC : Centers for Disease Control and Prevention  
UHT : Ultra High Temperature  
LTLT : Low Temperature Long Time  
HTST : High Temperature Short Time  
MAP : Modifiye Atmosfer Paketleme  
MDR : Multidrug Resistant  
PCNV : A Provisional Committee on Nomenclature of Viruses  
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses  
CRISPR-Cas :  
USFDA : U. S. Food and Drug Administration  
USDA : U. S. Department of Agriculture  
FDA : Food and Drug Administration  
HMF : Hidroksimetil furfural  
IHC : International Honey Committee  
GAE : Gallik asit eşdeğeri

MIC : Minimum Inhibitory Concentration  
MBC : Minimum Bactericidal Concentration  
OD : Optic Density  
MOI : Multiplicity of Infection

# 1. GİRİŞ

Antibiyotik direnci dünya genelinde önemli sağlık problemlerinden bir tanesidir. Birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gösteren Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tedavi edilemeyen enfeksiyonlara neden olmaktadır [1]. Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasının en önemli nedeni de toplum içinde ve hastanelerde çok fazla ve bilinçsiz kullanımudur. Bu nedenle antibiyotik dirençli bakterilerle mücadele etmek amacıyla yeni yöntemlerin ve yaklaşımların araştırılması gerekmektedir.

Bakteriyofajlar veya fajlar bakterileri lize eden bakteriyel virüslerdir. Fajlar 1915 ve 1917 yılları arasında Felix d'Herelle ve Frederick Twort tarafından keşfedilmişlerdir. Fajlar keşfedildiklerinden bu yana insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadırlar [2]. Fajları tedavi edici ajan olarak insanlar üzerinde ilk kullanan kişi d'Herelle olmuştur. D'Herelle 12 yaşındaki bir çocukta görülen dizanteri hastalığını tedavi etmek amacıyla fajları kullanmış ve birkaç gün içerisinde hastalık belirtilerinin giderek kaybolduğunu keşfetmiştir. 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin keşfedilmesi ile batı toplumlarında faj terapi uygulamaları terk edilmiştir. Fakat Polonya, Ukrayna gibi Doğu Avrupa ülkeleri ve Sovyetler Birliği faj terapi araştırmalarına ve uygulamalarına devam etmişlerdir. Gürcistan'da Eliava Enstitüsü ve Polonya'da Hirszfelt Enstitüsü gibi kurumlar faj terapi alanında çalışmalar yapmış ve faj ürünlerinin ticarileştirmişlerdir. İlerleyen yıllarda bazı patojenlerin antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Yeni antibiyotik üretimine rağmen bakteriler bunlara da direnç geliştirmişlerdir. Bu nedenle sağlık, gıda, tarım ve veterinerlik gibi birçok alanda antibiyotik dirençli bakteriler ciddi sorunlara neden olmaktadır. Antibiyotik dirençli bakterilerin yarattığı sorunlar nedeniyle 1980'li yıllardan sonra faj terapiye olan ilgi tekrar artmıştır. Bu zamana kadar faj terapinin ve insanlarda, hayvanlarda veya tarımda kullanımı ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Faj terapinin alternatif yöntem olarak seçilmesinin nedeni fajların antibiyotiklere kıyaslandığında birçok avantaja sahip olmasıdır. Antibiyotikler bakteri türleri bazında seçicilik göstermediklerinden dolayı kullanıldıklarında tüm mikroflorayı etkilemektedirler.

Fakat faj kullanımında bu durum söz konusu olmadığı için bu durum fajların antibiyotiklere kıyasla önemli bir avantajdır [3].

Antibiyotik dirençli patojenlerin engellenmesi ile ilgili diğer bir alternatif yöntem ise bakterilerin doğal antimikrobiyal maddelerle inhibe edilmesidir. Literatürde birçok çalışma bitki ekstraktları gibi doğadan elde edilen maddelerin patojen bakterilerin inhibisyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Literatürde propolis, pekmez (veya melas) ve bitki ekstraktları antimikrobiyal etkisi sıkça araştırılan maddelerdir. Bu maddeler aktif biyomoleküller içermektedirler. Bu nedenle patojen bakterilere karşı kullanılacakları ve insan sağlığı üzerinde de olumlu etkilere sahip oldukları birçok çalışmada araştırılmıştır. Fakat literatürde bu maddelerin fajlarla olan etkileşimi ve birlikte kullanılmaları halinde nasıl bir etki gösterecekleri araştırılmamıştır. Literatürdeki faj sinerjizm veya faj etkileşim çalışmaları genellikle antibiyotikler ile yapılan çalışmalardır.

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle doğal bitki ekstraktları, pekmez ve propolisin patojen bir bakteri olan *E. coli* O157:H7 üzerine olan antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Antibakteriyel etki agar ve sıvı ortam olmak üzere iki farklı şekilde incelenmiştir. Sıvı ortam deneyleri ile örneklerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (minimum inhibitory concentration, MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (minimum bactericidal concentration, MBC) değerleri belirlenmiştir. Çalışma kapsamında tüm örneklerin toplam fenolik madde değerleri ile pekmez örneğinin HMF değerleri de belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarının antibakteriyel etkiden sorumlu olduğu daha önceden yapılan çalışmalardan da bilinmektedir. Antibakteriyel etki incelendikten sonra bitki ekstraktları, pekmez ve propolisin altı farklı *E. coli* O157:H7 fajı ile olan etkileşimleri incelenmiştir. Bu etkileşimin belirlenmesi amacıyla öncelikle agar ortamında denemeler yapılmıştır.

Tüm pekmez örneklerinin tp3 fajının plak boyutunu arttırdığı görülmüştür. Fakat en iyi etki T adlı pekmez örneğinde görüldüğü için sıvı ortam denemelerine T örneği ve tp3 fajı ile devam edilmiştir. Yalnızca fajın ve faj-pekmez karışımının sıvı ortamda antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi ve faj-pekmez etkileşiminin incelenmesi amacıyla zaman-ölüm eğrisi (Time kill curve) deneyi yapılmıştır. Pekmez varlığında tp3 fajının agar ortamındaki plak büyüklüklerinin arttığı görüldüğü için tp3 fajının pekmez varlığında ve yokluğunda tek aşamalı gelişme

eğrisi çıkarılmıştır. Tek aşamalı geleişme eğrisinin sonuçlarına göre patlama büyüklükleri ve latent dönem süreleri hesaplanmıştır. Ayrıca faj duyarlılığı denemesi ile pekmezin farklı konsantrasyonlarda bulunması ve bulunmamasının faj titresi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda pekmez varlığının faj plak boyutunu ve fajın patlama büyüklüğünü arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak faj ile doğal antimikrobiyal maddelerin birlikte kullanılarak patojen bakterilerin inhibisyonunun sağlanabileceği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Patojen Bakteriler

#### 2.1.1. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler, Bulaşı Yolları, Neden Olduğu Hastalıklar

Son yıllarda gıda kaynaklı hastalıkların artması dünya genelinde endişelerin oluşmasına yol açmıştır. Popülasyon, gıda üretim ve tüketimi, gıda tedarik zincirinin artması gibi etkenler nedeniyle gıda güvenliği ile ilgili endişeler artmaya devam etmektedir. Hastalık Koruma Ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) verilerine göre her yıl 48 milyon insan gıda kaynaklı patojen bakteriler nedeniyle hastalanmakta ve bu hastalığa yakalanan insanların 3000'i hayatını kaybetmektedir [4]. Su, lağım, hava, toprak, işletme yüzeyleri, paketlenme, dışkı ve gıda prosesleri gibi birçok nedenle gıdalar kolaylıkla kontamine olabilmektedir [5].

Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklara gıda ile kontamine olmuş bakteri, bakteri toksinleri, maya, küf ve virüsler neden olmaktadır. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella*, *Brucella abortus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* önemli gıda patojeni olan bakterilerdir. CDC raporuna göre 2016 yılında ABD'de 839 gıda kaynaklı hastalık salgınlarının meydana geldiği bildirilmiştir. Bu salgınlar sırasında 875 kişi hastanelik olmuş, 17 kişi yaşamını yitirmiştir [6].

Gıda kaynaklı hastalıklar üç gruba ayrılabilirler ve bunlar şu şekildedir [7];

1. İntoksikasyon veya zehirlenme
2. Enfeksiyon
3. Toksikoenfeksiyon

*İntoksikasyon*: Gıda kaynaklı intoksikasyonlar veya gıda zehirlenmeleri gıdanın içerisinde daha önce oluşturulmuş toksinlerin alınması ile meydana gelmektedir. Semptomlar genellikle hızlı meydana gelmektedir. Alınan toksinin çeşidine göre semptomlar çeşitlilik göstermektedir. En yaygın olarak bilinen intoksikasyonlar stafilokokal intoksikasyon ve botulizmdir. Bu tür hastalıklarda canlı patojen hücreleri değil de aktif toksin içeren gıdayı tüketmek hastalığa neden olmaktadır.



Hastalıkların genel belirtileri kusma, bulantı, karın krampları ve ishal şeklindedir [7], [8].

*Enfeksiyon:* Gıda kaynaklı enfeksiyonlar enterik patojen bakteri ile kontamine olmuş gıda/suyun tüketilmesi ile meydana gelmektedir. *Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Shigella, Campylobacter, Yersinia enterocolitica* ve *Vibrio* enfeksiyonları meydana getiren önemli patojenlerdendir [7].

*Toksikoenfeksiyon:* Bu grup hastalıklar daha önce bahsedilenlerden farklıdır. Burada canlı hücre vücuda alınır ve patojen vücut içinde toksin üretimine başlamaktadır. *Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Vibrio cholerae,* enteropatojen *Escherichia coli* bu tür hastalıklara sebep olan önemli bakterilerdendir [7].

### **2.1.2. Patojen Bakterilerin Kontrolü**

Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklar dünya genelinde yaygın ve devam eden bir sorundur. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde birçok gıda kaynaklı hastalıklar meydana gelmektedir. Hastalıkların birçoğu ishal, kusma gibi rahatsızlıklarla hafif bir şekilde atlatılsa da bazen ciddi ve ölümcül olabilmektedir. Özellikle çocuklarda meydana gelen hastalıklar ciddi etkilere neden olmaktadır [9]. Gıdalarda bozulmaların ve gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçmek amacıyla gıdalardaki bozucu veya patojen bakteriler tamamen uzaklaştırılmalı veya sayıları en aza indirilmelidir [7]. Gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla birçok fiziksel ve kimyasal işlem mevcuttur. Fakat bu yöntemler bazen etkili olmamakta ve gıda kaynaklı hastalıklar meydana gelmektedir.

Gıdalardaki koruma yöntemleri alt başlıklar halinde incelenmiştir.

*Temizlik ve sanitasyon ile kontrol:* Sanitasyonun asıl amacı üretim ve paketleme gibi aşamalar sırasında gıdaya çevreden bulaşabilecek her türlü patojenin uzaklaştırılmasıdır. Uygun sanitasyon işlemleri gıdadaki mikrobiyal yükün azalmasına ve mikrobiyal yüke bağlı olarak oluşabilecek sorunların ortadan kalkmasına yardımcı olmaktadır. Gıdadaki mikrobiyal yükün azaltılması ile ürünlerin raf ömrü uzatılabilir, gıda patojenlerinden kaynaklanan hastalıklar önlenmektedir. Ayrıca birçok proses için kullanılan ilk ürünün mikrobiyal

yükünün az olması o üründen üretilebilecek ikincil ürünlerinde kolay üretilmesine ve daha iyi bir ürün ortaya çıkmasına yardımcı olacaktır. Örneğin az miktarda bakteri içeren sütün pastörize süre veya UHT süte işlenmesi daha kolay olacaktır [7].

Sanitasyon işlemleri düzgün yapıldığında işletme maliyetini azalttığı ve mikrobiyal kontaminasyonu da önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Tüketici baskıları ve mevzuattan gelen kurallar nedeniyle üretimin her aşamasında hijyene dikkat edilmeli ve hijyen kuralları iyi uygulanmalıdır. Sanitasyon işleminde patojen mikroorganizmaların uzaklaştırılmasının yanı sıra toprak artıkları, gıda kalıntıları ve bunun gibi yabancı maddelerin uzaklaştırılması da önemlidir [9].

*Fiziksel uzaklaştırma ile kontrol:* Mikroorganizmalar fiziksel olarak gıdalardan uzaklaştırılabilmektedir. Bu işlemler genellikle prosesin diğer aşamalarını kolaylaştırmak amacıyla yapılmaktadır. Fiziksel uzaklaştırma santrifüj, filtrasyon, soyma (trimming) ve yıkama gibi işlemleri kapsamaktadır.

*Sıcaklık ile kontrol:* Sıcaklık uygulamasındaki asıl amaç bakteri, maya, küf, virüs gibi mikroorganizmalara ait vejetatif hücrelerin ve sporların yok edilmesidir. Sıcaklık, gıdadaki patojen mikroorganizmaların ve bozucu mikroorganizmaların yok edilmesi için uygulanmaktadır. Ayrıca gıda kalitesinde olumsuz etkiler yaratabilecek enzimlerin inaktive edilmesi içinde ısı işlem uygulaması yapılmaktadır. Bazı mikroorganizmalar gıdada toksin üretebilmektedirler. Eğer bu toksinler ısıleme hassas ise kolaylıkla inaktive edilebilmekte ve bu ürünlerin tüketimi herhangi bir hastalığa neden olmamaktadır. Fakat ısıya dirençli toksinler ısı işlem ile yok edilememektedir. Bu durumda gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir [7].

Isıl işlem ile hücreler veya sporlar ısı şokuna uğrayabilir, zarar görebilir veya ölebilirler. Isı şokuna uğramış hücreler ısıtma işlemine bir miktar direnç kazanır. Yaralanmış hücreler ve sporlar ise kendilerini yenileyebilmektedirler. Isıl işlemin etkinliği gıdanın yapısı, mikroorganizmanın yapısı ve proses şartları ile yakından ilgilidir.

Pastörizasyon işlemi gıdalarda patojen bakterilerin kontrol altına alınması için sıklıkla kullanılan işlemlerdendir. Pastörizasyon işlemi genellikle ikiye ayrılmaktadır. Bunlar; Low Temperature Long Time (LTLT) ve High Temperature

Long Time (HTST) şeklindedir. Pastörizasyon işlemi uygulanırken sıcaklık işlemi mikroorganizmaları öldürecek ve gıdaya en az zararı verecek şekilde ayarlanmaktadır.

*Düşük sıcaklık ile kontrol:* Düşük sıcaklık ile kontrolün asıl amacı mikroorganizma gelişimini engellemek veya azaltmaktır. Düşük sıcaklıklarda sporların çimlenmesi de azalmaktadır. Bazı koşullar altında ise düşük sıcaklık uygulama mikroorganizmaların ölümüne de yol açabilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığında enzim üretimi, metabolik aktivite ve büyüme hızı maksimum seviyededir [7]. Birçok gıda bozulması temelinde kimyasal reaksiyonlara dayandığı için sıcaklığın düşmesi kimyasal reaksiyon hızını yavaşlatmakta ve gıda bozulmalarına engel olmaktadır [10]. Buzdolabı sıcaklığında saklanan gıdaların raf ömürleri kısıtlıdır. Bu sıcaklıkta mikroorganizmalar yavaşta olsa üremeye başlamakta ve bir süre sonra gıdanın bozulmasına yol açmaktadır. Dondurulmuş gıdalarda mikroorganizma hücreleri yavaşça ölmektedir (Bu durum sporlar için geçerli değildir.). Fakat uzun depolama sürelerinde bile bazı mikroorganizmalar hayatta kalabilmektedir [7].

*Düşük su aktivitesi ( $a_w$ ) ile koruma:* Birçok mikroorganizma gelişmek ve metabolik faaliyetlerinin devam ettirebilmek için suya ihtiyaç duymaktadır. Gıdalarda  $a_w$  değerinin düşürülmesi, mikroorganizma hücrelerinin gelişiminin yavaşlamasına ve hücrenin yaralanmasına sebep olmakla beraber sporların çimlenmesini de engellemektedir. Bunlara ek olarak düşük su aktivitesi değeri toksin üreten bakteri ve küflerin toksin üretmesine de engel olmaktadır. Gıdalarda su, bağlı su ve serbest su olarak iki farklı formda bulunmaktadır. Sadece serbest su miktarı mikrobiyolojik aktivite ile ilgilidir. Mikroorganizmalar gıdalardaki bağlı suyu kullanamamaktadırlar. Gıdalardaki su miktarı dehidrasyon, kristalizasyon ve suyun bağlanması için çözücü madde ekleme gibi yöntemlerle düşürülebilir [7].

*Düşük pH ve organik asitlerle kontrol:* Organik asitler ve pH gıdalarda mikroorganizmaların kontrolünde önemli bir yere sahiptir. Mikroorganizmaların iyi bir şekilde gelişebilmesi için ortam pH'nın optimum seviyede olması gerekmektedir. Çok düşük veya yüksek pH değerlerinde mikroorganizma gelişimi yavaşlamakta veya durmaktadır. Organik asitler gıdalarda koruyucu madde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Asetik, sorbik, propiyonik, sorbik asit en sık

kullanılan organik asitlerdendir. Bazı organik asitler ise ürünün içinde doğal olarak bulunabilmektedir. Gıda koruyucu maddesi olarak zayıf organik asitlerinin kullanılmasının amacı gıdanın pH değerinin düşürerek mikroorganizmanın üremesinin engellemektir [7].

*Modifiye atmosfer ile kontrol:* Modifiye atmosfer paketlemenin (MAP) amacı gıdalarda istenmeyen mikroorganizma yükünün azaltılmasıdır. Aerobik mikroorganizmaların gelişimi vakum paketlenmiş, %100 CO<sub>2</sub> veya %100 N<sub>2</sub> ile paketlenmiş ürünlerde engellenebilir. Fakat bu koşullar altında anaerobik veya fakültatif anaerobik mikroorganizmalar gelişebilmektedir.

*Antimikrobiyal koruyucular ile kontrol:* Proses sırasında doğal olarak oluşan veya sonradan eklenen birçok madde mikrobiyal gelişimi engelleyebilir. Antimikrobiyaller gıdalardaki mikroorganizmaları öldürmek veya gelişmelerinin engellemek amacıyla az miktarda kullanılırlar. Koruyucular genellikle kombinasyonlar halinde kullanılmaktadırlar. Farklı koruyucular farklı mikroorganizmalara etki etmektedir. Bazı koruyucular Gram pozitif bakterilere etkili iken bazıları Gram negatif bakterilere karşı etkilidir [7], [11].

*Işınlama ile kontrol:* Gıdalardaki patojen mikroorganizmalar ışınlama teknolojisi ile inhibe edilebilmektedir. Işınlama işlemi bakteri, maya, küf, spor ve virüsleri tamamen veya kısmen yok edebilmektedir. Fakat toksinleri ve istenmeyen enzimleri inaktive edememektedir. Işınlama işlemi mikroorganizmayı direk olarak veya dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Direk etki şekli DNA'dan elektron uzaklaşmasına ve DNA yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Başka bir etki ise su moleküllerinin iyonlaşması ile olmaktadır. Su molekülünün iyonlaşması sonucu oluşan hidrojen ve hidroksil radikalleri oldukça reaktiftir ve DNA oksidasyonuna neden olurlar. Işınlama işlemi hücre membranında ve diğer yapılarda hasara neden olmaktadır. Işınlama işlemi ile mikroorganizmaların inhibisyonu uygulamanın dozuna ve süresine bağlı olmakla birlikte çevre koşulları, gıdanın yapısı ve mikroorganizma çeşidi de inhibisyon için önemli parametrelerdendir.

### 2.1.3. Patojen Bakterilerdeki Antibiyotik Direnci

Yirminci yüzyılın başlarında antibiyotiklerle mücadelede geleneksel yöntemler kullanılıyordu. Fakat penisilin keşfedildikten sonra patojenlerle mücadelede kullanılmaya başlanmıştır. Bunu izleyen dönemlerde keşfedilen antibiyotiklerin sayısı giderek artmış ve patojen bakterilerle mücadelede yeni bir dönem başlamıştır [12]. Antibiyotikler aktinomisetler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen, bakteride bulunan bazı yapılara müdahale ederek antimikrobial etki gösteren kimyasal bileşiklerdir. Antibiyotiklerin bakteristatik ve bakterisidal olmak üzere iki farklı etki mekanizması bulunmaktadır. Bakteristatik etki bakteri gelişimini engellerken, bakterisidal etki bakterilerin ölümüne neden olmaktadır [13]. Antibiyotikler temelde 5 farklı etki mekanizmasına sahiptirler. Bunlar şu şekilde sıralanabilmektedirler;

1. Hücre duvarı sentezinin engellenmesi
2. Protein sentezinin inhibe edilmesi
3. Nükleik asit sentezinin engellenmesi
4. Metabolik yolun engellenmesi
5. Hücre membranının yapısının bozulması

Bakteriler birçok yolla antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedirler. Bakteriler  $\beta$ -laktamaz gibi enzimleri üreten genlere sahip olabilir. Böylelikle antimikrobial ajan bakteriye ulaşmadan önce inhibe edilmiş olmaktadır. İkinci olarak bakteri antimikrobial ajanı bakterideki hedef bölgeye ulaşmadan önce hücreden uzaklaştırabilmektedir (Efflux pumps). Bunlara ek olarak bakteri hücre metabolik aktivitelerle hücre duvarında değişikliklere sebep olmakta ve antimikrobial ajan hücre duvarına tutunamamaktadır [14].

Antibiyotikler insanlarda ve hayvanlarda görülen enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Antibiyotik direnci veya çoklu ilaç direnci (Multidrug resistance, MDR) dünya genelinde önemli bir sorundur. Antibiyotik dirençli gıda kaynaklı patojen bakteriler insan sağlığı ve gıda üretimi açısından önemli problemlere neden olmaktadır. CDC raporuna göre *Campylobacter*, *Salmonella* Typhi, nontyphoidal salmonellae ve *Shigella* önemli antibiyotik direnci bulunan gıda kaynaklı patojenlerdendir [15]. Antibiyotik dirençli bakteriler farklı ortamlarda bulunabilmekte ve bu ortamlarda gıda zincirine girebilmektedirler.

Antibiyotik dirençli bakteriler gıda zincirine insan, çiftlik hayvanları, taze meyve ve sebzeler, et ve et ürünleri, kümes hayvanları gibi çeşitli yollardan girebilmektedir [16]. Literatürde çeşitli gıdalardan birçok antibiyotik dirençli bakteri izole edilmiştir. Çizelge 2.1.'de bu çalışmalardan bazıları gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Gıdalardan izole edilen antibiyotik dirençli bakteriler

Gıda	Ülke	Bakteri	Referans
Tavuk	Japonya	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i>	[17]
Et ve süt ürünleri	Mısır	<i>Salmonella enteritidis</i>	[18]
Çiftlik hayvanları	Çin	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	[19]
Peynir	Fransa	<i>Enterococcus faecalis</i>	[20]
Tavuk	Türkiye	<i>Enterococci</i>	[21]
Kırmızı et	İspanya	<i>Enterococci</i>	[22]
Kümes hayvanları ve kırmızı et	ABD	<i>Enterobacteriaceae</i>	[23]
Et	Kanada	<i>Salmonella</i>	[24]
Yumurta	Grenada	<i>Escherichia coli</i>	[25]
Hindi eti	Kanada	<i>Campylobacter, Salmonella, Escherichia coli</i>	[26]

Antibiyotik dirençli bakteriler nedeniyle meydana gelen salgınlar dünya genelinde önemli bir sorundur. *Salmonella*'nın antibiyotik dirençli (Multidrug Resistant, MDR) suşları en fazla gıda kaynaklı hastalıklardan meydana gelen salgınlara neden olan suşlardır [15].

Patojen bakterilerin birçoğunun antibiyotiklere direnç geliştirmesi nedeniyle patojenlerle mücadele etmek amacıyla yeni alternatif metotlar geliştirilmeye

çalışılmaktadır. Bu yöntemler arasında fekal transplantasyon, faj terapi, faj lizinlerinin kullanılması, bakteriosin ve endolizin gibi yöntemlerle bağırsak florasının düzenlenmesi yer almaktadır. Faj terapi ve faj enzimlerinin kullanılması umut vaat eden yöntemlerden bir tanesidir. Jado ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fajlar tarafından üretilen litik enzimler sepsise neden olan antibiyotik dirençli *Streptococcus pneumoniae* bakterisinin inhibisyonu için kullanılmıştır. Fare modelleri üzerinde yapılan denemelerde faj lizinlerinin fareleri sepsisten ve buna bağlı ölümden koruduğu bildirilmiştir [27]. Yapılan bir başka çalışmada antibiyotik dirençli *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin neden olduğu kronik otitisin tedavisinde faj preparatlarının kullanımı araştırılmıştır. Faj kullanılan hastalarda *P. aeruginosa* sayısının önemli ölçüde düştüğü ve faj kullanımına bağlı olarak hastalarda herhangi bir yan etki görülmediği bildirilmiştir [28]. Bunlara ek olarak doğal bitki ekstraktlarının da antibiyotik dirençli bakterilere karşı kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili araştırmalar sürmektedir. Bir çalışmada beş farklı bitki ekstraktı *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin MDR suşlarına karşı olan antimikrobal etkisi araştırılmış ve üç farklı ekstraktın bu suşlara karşı etkili olduğu bildirilmiştir [29]. Bitki ekstraktlarının ve fajların antibiyotiklerle birlikte kullanılarak dirençli bakterilere olan etkisinin incelenmesi de sıklıkla çalışılan konular arasındadır. Farklı bitki ekstraktları ile antibiyotik arasındaki sinerjismi inceleyen bir çalışmada *R. coriaria* ekstraktı ile antibiyotik sinerjizm bulunmuş ve *P. aeruginosa* ile mücadelede kullanılabileceği vurgulanmıştır [30]. Literatürde faj ile antibiyotikleri bir arada kullanılarak dirençli patojenlerin eliminasyonunu amaçlayan birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada farelerde vancomycin dirençli *Enterococcus faecalis*'in neden olduğu hastalığın iki farklı faj içeren faj kokteyli ile tedavi edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca aynı deneyde faj ile birlikte antibiyotik kullanımının ek faydalar sağladığı da bildirilmiştir [31]. Letrado ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada faj endolizinin ve cefotaxime birlikte kullanılarak antibiyotik dirençli *Streptococcus pneumoniae* tedavisinde kullanılmıştır. Farelerde üzerinde yapılan *in vivo* denemelerde faj ile antibiyotik kombinasyonunun hastalıkla mücadele de başarılı olduğu belirtilmiştir [32].

## 2.2. Fajlar

### 2.2.1. Fajların Keşfi, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları

Geçmiş kaynaklar incelendiğinde, fajların var olabileceğine ilişkin çeşitli bilgiler yer almaktadır. 1896 yılında Hankin, Hindistan'da buluna nehir sularının özellikle *Vibrio cholera* ve birçok patojen bakteriye karşı antimikrobiyal etki gösterdiğinin rapor etmiştir [33]. 1915 yılında, İngiliz mikrobiyolog Frederick Twort, *Staphylococcus* kültürünü filtreden geçirmiş ve elde ettiği filtrati çeşitli *Staphylococcus* suşları üzerine damlatmıştır. Twort yaptığı bu çalışma sonucunda, damlatma yaptığı bölgelerde berrak zon oluşumu gözlemlemiş fakat bu olayın nedenini tam olarak açıklayamamıştır [34]. Bu yayın tarihteki bakteriyofajlarla ilgili ilk yayın olarak kabul edilmektedir. İlk 'Bakteriyofaj' terimi ise Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Herelle tarafından ortaya atılmıştır. D'Herelle dizanteri hastalarının dışkısından elde edilen filtratın bakterilere karşı antagonistik etki gösterdiğinin gözlemlemiştir [35]. D'Herelle fajların bakteriler üzerindeki litik etkisinin gözlemedikten sonra, bu doğal antibakteriyellerin tedavi edici ajan olarak kullanmaya karar vermiş ve böylelikle antibiyotik öncesi dönem başlamıştır. Basilli dizanteri ve kolera hastalığını tedavi etmek isteyen d'Herelle, fajları hastalarda denemedenden önce güvenliğinden emin olmak amacıyla fajları kendisinde, çalışma arkadaşlarında ve ailesinin üzerinde denemiş daha sonra hastalara uygulamıştır [35]. Aynı dönemde fajlar ile ilgili olgular dünyanın farklı yerlerindeki araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir. N.F. Gamaleya, *Bacillus anthracis* hücrelerinin lize olmasını tanımlarken, 1917 yılında George Eliava *Vibrio cholera* hücrelerinin kaybolduğunu gözlemlemiştir [33].

Bakteriyofaj (faj), en genel tanımıyla bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bakteriyofajlar doğada en yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardan olup, sayılarının yaklaşık  $10^{31}$ - $10^{32}$  olduğu tahmin edilmektedir [36]. Fajlar zorunlu parazit olan mikroorganizmalardandır. Virüslerin enerji üretebilecek veya protein sentezi yapabilecek bir mekanizmaları bulunmadığından dolayı çoğalmak için canlı bir hücreye ihtiyaç duymaktadırlar [33]. Fajlar doğada toprak, dışkı, derin sular, vücut ve lağım suları gibi pek çok yerde yaygın olarak bulunmakla birlikte genellikle konakçı hücreleri ile birlikte bulunurlar.

Fajlar litik döngü ve lizojenik döngü olmak üzere iki farklı yaşam döngüsüne sahip olabilirler. Litik döngüye sahip fajlara virü lent faj ve lizojenik döngüye sahip fajlara



ise temperent faj denilmektedir. Litik döngü beş aşamadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; fajın konakçı bakterisine tutunması, fajın genetik materyalini bakteri hücrelerine aktarması, faj genomunun ve proteinlerin sentezlenmesi, yeni vironların (yavru fajlar) oluşumu ve hücrenin lize olması ile fajların ortaya çıkması şeklindedir. Polisakkarit, pili ve flagella gibi bileşenler ile fajlar bakteri yüzeyine tutunmaktadır. Bu tutunma işlemi geri dönüşümsüz bir olaydır. Faj bakteriyeye tutunduktan sonra DNA'sını bakteri hücrelerinin içerisine aktarır. Bakteri içerisine DNA aktarılması ile birlikte DNA ve RNA polimeraz enzimlerinin yardımıyla faj genetik materyalinin replikasyonu ve protein sentezi başlamaktadır. Replikasyonu tamamlanmış DNA kapsid içine paketlenir ve kuyruk kapsit ile birleştirilir [37]. Oluşan yeni fajların dışarı çıkabilmesi için bakteriyel lizis gereklidir. Bazı litik fajlar 'amurin' isimli tek bir proteini peptidoglikan sentezini inhibe etmek için kullanır. Fakat birçok litik faj hücre lizisi için 'holin' ve 'endolizin' enzimlerinin birlikte kullanılmaktadır. Holin enzimi stoplazmik zarı bir geçiş bölgesi oluşturarak endolizinin peptidoglikan tabakasına ulaşmasını sağlamaktadır. Daha sonra endolizin peptidoglikan tabakasını parçalar ve hücre lizisi gerçekleşmektedir [35], [38], [39]. Bir faj bakteriyeye tutunduktan ve bakteri hücresi lize olduktan sonra açığa yaklaşık 200 yeni viron çıkmaktadır. Bu nedenlerden dolayı faj terapi uygulamalarında litik fajlar kullanılmaktadır.

Lizojenik yaşam döngüsü de litik yaşam döngüsünde olduğu gibi fajın bakteriyeye tutunması ve genetik materyalini bakterinin içerisine aktarması ile başlamaktadır. Bu türdeki fajların genetik materyali bakteriyel kromozoma aktarılmaktadır. Lizojenik fajlar bakteriyel lizise neden olmamaktadırlar [40].

Fajlar 1915 ve 1917 yıllarında Frederick Twort ve Felix d'Herelle tarafından keşfedilen bakteriyel virüslerdir. Fakat daha sonra Twort bakteriyofaj araştırmalarını terk etmiş ve omurgalı virüsleri ile çalışmaya başlamıştır. d'Herelle ise faj araştırmalarına devam ederek bakteriyofaj tanımını literatüre kazandırmış ve faj terapi alanında çalışmalarına devam etmiştir [41]. 1933 yılında Burnet, fajların birden fazla gruba ait olduğunu ve partikül büyüklüğü, konakçı spesifikliğı, serolojik özellikleri ve depolama stabilitesi gibi özellikler bakımından farklılaştığını keşfetmiştir [42], [43]. Faj keşfedildikten sonra farklı araştırmacılar fajların sınıflandırılması için çeşitli öneriler geliştirmişlerdir. Fajlar için ilk sınıflama işlemi keşfedildikleri dönemde d'Herelle tarafından yapılmıştır. Holes fajları tek bir sınıfa

ve cinse ait olan alt sınıflara ayırmıştır [44]. Elektron mikroskopunun keşfinden sonra, Ruska virüsleri elektron mikroskopunun kullanarak morfolojik özelliklerine göre sınıflandırmıştır [33]. 1962 yılında Lwoff, Horne ve Tournier virüsleri nükleik asit ve morfolojik özelliklerini baz alarak gruplara ayırmışlardır [41], [44]. 1967 yılında Bradley fajları morfolojik özelliklerine ve içerdikleri nükleik asit çeşitlerine göre A'dan F'ye kadar 6 gruba ayırmıştır [45]. Bu gruplar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Bradley tarafından nükleik asit çeşidine ve morfolojik özelliklere göre yapılan faj sınıflandırılması

GRUP	MORFOLOJİK ÖZELLİK	NÜKLEİK ASİT ÇEŞİDİ
A	Kısalabilen (Kontraktıl) kuyruk	2-DNA
B	Uzun kısalamayan kuyruk	2-DNA
C	Kısa kısalamayan kuyruk	2-DNA
D	Kuyuksuz geniş kapsomerli	1-DNA
E	Kuyuksuz küçük kapsomerli	1-RNA
F	Filamentöz	1-DNA

2-DNA, yeşil floresans veren çift sarmallı DNA ;1-DNA, kırmızı floresans veren tek sarmallı DNA ;1-RNA, kırmızı floresans veren RNA.

1965 yılında virüslerin adlandırılması için 'A Provisional Committee on Nomenclature of Viruses (PCNV)' adında bir komite kurulmuştur. Bu komitenin adı daha sonra Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) olarak değiştirilmiştir. ICTV 1971 yılında yayınladığı ilk raporunda fajları Bradley'nin sınıflandırması baz alarak sınıflandırmıştır. Fajlar; T-grup faj, I, lipit içeren faj PM2, fX grup faj, filamentöz faj ve RNA içeren faj olarak 6 farklı cins olarak sınıflandırılmıştır [41], [44].

### 2.2.2. Faj Terapinin Tarihi ve Kullanım Alanları

Bakteriyofajlar, d'Herelle tarafından keşfedilmelerinin ardından kısa bir süre sonra patojen bakterilerle mücadelede kullanılmaya başlanmıştır. D'Herelle fajları ilk defa 12 yaşındaki bir çocukta görülen dizanteri hastalığının tedavisinde kullanmaya çalışmıştır. D'Herelle faj karışımını çocuğa vermeden önce hastane çalışanları ve kendi üzerinde deneyerek fajların güvenilirliğini kontrol etmiş ve daha sonra çocuğa uygulamıştır. Uygulamanın ardından birkaç gün sonra hastalık belirtilerinin tamamen ortadan kalktığı görülmüştür [46]. Fakat bu çalışmanın sonuçları yayınlanmamıştır. Faj terapi konusunda yayınlanan ilk çalışma, Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin tarafından yürütülen *Staphylococcus* kaynaklı cilt hastalıklarının tedavisine yönelik yapılan çalışmadır [33], [46]. 1916 ve 1930 yılları arasında, d'Herelle ve çalışma arkadaşları Dünya'nın çeşitli ülkelerinde meydana gelen kolera salgınları ile mücadele etmek amacıyla fajları kullanmışlardır [34].

Fajların tedavi edici ajan olarak kullanılması ile birlikte ticari faj preparatlarının üretimi de başlanmıştır. İlk ticari faj preparatı d'Herelle'nin Paris'te bulunan laboratuvarında üretilmiştir. D'Herelle'nin laboratuvarında üretilen beş farklı faj preparatı daha sonra Fransız firması olan L'Oreal tarafından satışa sunulmuştur [46]. 1923 yılında Gürcistan'lı biyolog George Eliava tarafından Felix d'Herelle ile beraber kurulan Eliava Institute (Tiflis, Gürcistan) faj terapi konusunda önemli araştırmalar yapmıştır. 1937 yılında Eliava Stalin tarafından tutuklanmış ve idam edilmiştir. Buna rağmen enstitü ayakta kalmış ve faj terapi çalışmalarına devam etmiştir. Eliava Enstitü'sü *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* ve birçok enterik patojene karşı faj geliştirmiş ve üretmiştir [46]. 1924 yılında, Rio de Janeiro'da kurulan Oswaldo Cruz Enstitüsü Latin Amerika ülkelerinde dizanteri ile mücadele etmek amacıyla faj preparatları üretmeye başlamıştır [34]. 1940'lı yıllarda ise Eli Lilly firması (Indianapolis, ABD), insanlarda kullanılmak üzere yedi farklı faj preparatı üretmiştir. Bu ürünler *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* gibi birçok patojen bakteriyi hedef alan ürünlerdir. Bu ürünler sıvı kültür halinde ve suda çözünür jel şeklinde hazırlanmış olup, abse, enfekte olmuş yara, üst solunum yolları enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır [46], [47]. 1952 yılında kurulan The Hirszfelt Institute of Immunology and Experimental Therapy (Wroclaw, Poland) isimli merkez ise *Shigella* enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla fajları kullanmıştır. Laboratuvar gün

geçtikçe gelişmiş ve septisemi, idrar yolları enfeksiyonu, operasyon sonrası oluşan enfeksiyonların tedavisi gibi birçok alanda faj preparatları geliştirmiştir. Birçok durumda, faj preparatları geleneksel antibiyotik tedavisine karşı direnç gösteren patojen bakteriler ile mücadele etmek amacıyla kullanılmıştır. Fajların klinikte kullanılması ile ilgili tüm ayrıntılı çalışmalar ise bu enstitü tarafından yayınlanmıştır [46], [48].

1940'lı yıllarında penisilin ve bunun gibi antibiyotiklerin keşfedilmesiyle birlikte batı toplumlarında faj terapiye olan ilgi azalmıştır. Fakat Sovyetler Birliği ve Polonya, Gürcistan gibi Doğu Avrupa ülkelerinde faj terapi çalışmalarına devam etmiştir. Özellikle Eliava Enstitü'sü ve Hirszfelt Enstitü'sü faj terapi alanında en çok araştırmayı yapan ve bu konuya en çok katkı sağlayan kuruluşlardır. Batı ülkelerinde faj terapi dönemi dört ana başlıkta incelenebilir ve bunlar; erken ilgi, şüpheli yaklaşım, terk ediş ve yeniden değerlendirme şeklindedir [47], [49]. Fajlar ilk keşfedildikleri zaman ciddi ilgi uyandırmış, fakat daha sonra kullanımının güvenliği ile ilgili şüpheler doğmuştur. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin keşfi ise fajlara olan ilgiyi tamamen azaltmıştır. Zamanla antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkması ile batı da faj terapiye olan ilgi tekrar artmıştır. 1980'li yıllarda faj terapi Smith ve Huggins'in çalışmaları ile faj terapi Batı toplumların da tekrar ilgi uyandırmıştır [50].

Fajların antibiyotiklere kıyasla birçok avantajı olmasına rağmen bazı olumsuz özellikleride vardır. Düşük bir ihtimalde olsa bakteriler fajları karşı da direnç geliştirebilmektedirler. Bakterinin faja karşı direnç geliştirmesi birden fazla yolla gerçekleşebilmektedir. Faj adsorbsiyonunun engellenmesi, restriksiyon modifikasyon sistemi, faj DNA'sının konakçı hücre içerisine girmesinin engellenmesi, mutasyonlar, CRISPR-Cas sistemi gibi yollar ile bakteri faja karşı direnç geliştirebilmektedir [51], [52]. Faj adsorbsiyonu faj yaşam döngüsünün ilk aşamasını oluşturmaktadır. Bakteri faj adsorbsiyonunu engellemek amacıyla, hücre duvarında bir yapı sentezleyerek faj tutunmasını engelleyebilmektedir. Birdiğer yol ise hücre dışı polimersentezi ile faj tutunmasını engellenmesi şeklindedir. Rekabetçi moleküllerin sentezide faj tutunmasını engelleyen yöntemler arasındadır [51]. Tüm bu direnç geliştirme mekanizmaları nedeniyle fajlar bazı durumlarda etkisiz kalabilmektedir.

### 2.2.3. Gıdalarda Faj Kullanımı

Popülasyonun artması ile birlikte gıda üretimi ve tüketiminde de ciddi bir artış yaşanmıştır. Bu artış nedeniyle de gıda patojenlerinden kaynaklanan hastalıklar da artış göstermiştir. Bu hastalıklar dünya genelinde önemli bir sorun olup her yıl gıda kaynaklı patojenler nedeniyle birçok insan hayatını kaybetmektedir. İyi üretim uygulamaları, kalite kontrol ve hijyen olanaklarının iyileştirilmesi, tarımsal alan ve gıda üretim alanında teknolojik gelişmelere rağmen, tüketici talepleri nedeniyle gıda güvenliği uygulamalarının iyileştirilmesi gerekmektedir [53], [54]. Buna ek olarak son zamanlarda doğal veya organik gıda tüketimine olan talebin artması ve kimyasal koruyuculara olan olumsuz tepkiden dolayı üreticilerin doğal ve çevre dostu olan gıda koruma yöntemlerine olan ilgisi de artmıştır. Günümüzde gıda koruma alanında birçok yöntem kullanılmaktadır. Fakat gıda koruma amacıyla kullanılan kimyasal dezenfektanlar ve UV koruma gibi fiziksel koruma yöntemleri zararlı etkilerinden dolayı tüketici tarafından tercih edilmemektedir. Ayrıca bazı koruma yöntemleri de gıdanın organoleptik özelliklerinin etkilemekte ve tüketici tarafından tercih edilmemektedir.

Tüm bu nedenlerden dolayı fajlar, doğal antimikrobiyal madde olarak kullanılmaya uygun adaylardır ve son yıllarda gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla faj kullanımına olan ilgi artmıştır. Bu amaçla faj kullanımı temel olarak üç grup ayrılabilir [55]. İlk olarak, gıda olarak kullanılacak yaşayan hayvanda patojen bakteri gelişiminin engellenmesi amacıyla fajlar direk olarak hayvan üzerinde kullanılabilir [53], [55], [56]. Kesim ve süt sağımı gibi işlemler sırasında gıdalar kolaylıkla kontamine olabilmektedir. Karkastan gelebilecek olan *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakteriler gıdalarda ciddi sorunlara neden olmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Hayvan üretimi yapılan çiftliklerde ve karkas gibi et ürünlerinde kullanılmak üzere U. S. Food and Drug Administration (USFDA) ve U. S. Department of Agriculture (USDA) onaylı ticari faj preparatları bulunmaktadır [53]. *Salmonella* ve *E. coli* kontaminasyonlarını ortadan kaldırmak amacıyla kesimden önce canlı hayvanın derisine ve tüyelerine sprey şeklinde uygulanabilen faj ürünleri bulunmaktadır. Büyük tavuk işletmeleri tarafından yapılan bir araştırmada ise hayvan üretimi yapılan çiftliklerde *Salmonella*'nın

azaltılmasının işletmeye giren *Salmonella* miktarını %15'e kadar azalttığı belirtilmiştir [55], [57]. Bunlara ek olarak dışkıdan gelebilecek kontaminasyonların azaltılması amacıyla canlı hayvana da faj terapi uygulanabilmektedir. Koyunla yapılan bir çalışmada, verilen DC22 fajının koyun dışkısında ki hedef bakteride bir azalmaya neden olmadığı bildirilmiştir. Bunun nedeni faj titresinin yetersiz olması ve fajın bağırsaklara gelene kadar aktivitesini sürdürememesi olabilir [58], [59]. Fakat koyunlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise CEV1 fajının uygulanmasının ardından bağırsaklarda *E. coli* O157 sayısında 2-3 log<sub>10</sub>'luk bir düşüş olduğu belirtilmiştir [58], [60]. İkinci olarak fajlar gıda üretimi yapılan işletmedeki çevrenin sanitasyonu için kullanılabilir. Gıda üretim hattındaki borular, tezgahlar ve gıda taşıma bantları gibi yüzeylerden veya işletme zemininden gelebilecek patojen bakteri kontaminasyonları faj kullanımı ile azaltılabilmektedir. Literatürdeki çeşitli araştırmalar gıda işletmelerinde bulunan sert yüzeylerde faj kullanımı ile patojen kontrolünün sağlanabileceğinin göstermiştir [61]–[63]. Ganegama Arachchi ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada ise *Listeria monocytogenes* bakterine ait üç fajın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde kullanılmasının paslanmaz çelik yüzeylerde *L. monocytogenes* kontaminasyonunu azalttığı belirtilmiştir [61]. Sert yüzeylerle yapılan bir çalışmada *E. coli* O157:H7 bakterisine ait faj kokteylinin yüzeydeki kontaminasyonu azalttığını göstermiştir [64]. Sert yüzeylere *Salmonella* tutunmasının ve biyofilm oluşumunun engellenmesi üzerine yapılan bir başka çalışmada ise faj kullanımının *Salmonella* tutunmasını 2,9 ve 3,0 log kob/cm<sup>2</sup> azalttığı ve biyofilm oluşumunu azalttığını göstermiştir [65]. Üçüncü olarak ise faj preparatları gıdanın üzerine direk olarak sprey şeklinde uygulanabilmektedir. Fajlar hemen hemen tüm gıdalarda, özellikle taze gıdalarda yüksek sayılarda zaten mevcuttur. Literatürde et, süt, peynir gibi gıdalardan faj izolasyonunun yapıldığı çalışmalarda mevcuttur [55], [66]. Tablo 1.'de gıdalara direk olarak faj uygulaması ile farklı gıda patojenlerinin kontrol altına alınmasını araştıran çalışmaların bir listesi gösterilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Taze gıdaların faj ile biyokontrolü ile ilgili çalışmalar

Gıda Kategorisi	Bakteri	Faj	Açıklama	Referans
Çery domates	<i>Salmonella</i> Newport	<i>Salmonella</i> fajlarından oluşan faj kokteyli	Dört farklı <i>Salmonella</i> faji içeren kokteyl tomateste <i>S. Newport</i> gelişimini kontrol altına almıştır.	[67]
Taze marul ve salatalık	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Faj kokteyli (BSPM4, MSP101, BSP22A)	Üç farklı faj içeren kokteyl taze marul ve salatalıkta 25°C'de 12 saat sonunda bakteri sayısını sırasıyla 4.7-5.5 log kob/cm <sup>2</sup> ve 4.8-5.8 log kob/cm <sup>2</sup> azaltmıştır.	[68]
Et	<i>E. coli</i>	EcoShield™	Faj kokteyli 24 saat sonunda et üzerindeki <i>E. coli</i> sayısını 0.63-1.16 log kob/cm <sup>2</sup> azaltmıştır.	[69]
Et ve süt	Shiga toksik <i>E. coli</i> (STEC)	Altı farklı faj içeren kokteyl	Faj kokteyli 4, 24 ve 37 °C'de et ve sütte bakteri sayısını önemli ölçüde azaltmıştır.	[70]
Süt, sucuk, marul	<i>Salmonella</i>	Faj LPST10	Farklı gıda matrislerinde bakteri sayısında azalma ve faj titresinde artış görülmüş.	[71]
Süt	<i>Salmonella</i> Typhimurium	P22	Sütte buluna <i>Salmonella</i> Typhimurium faj uygulaması ile azaltılmıştır.	[72]
Somon fileto ve deniz tarağı canlısı	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Faj SLMP1	Somon fileto ve deniz tarağı canlısına 10 <sup>2</sup> ve 10 <sup>4</sup> kob/g <i>Salmonella</i> uygulanmış ve faj kullanımı ile 4 °C'de bakteri miktarının tespit limitinin altına düştüğü belirtilmiştir.	[73]
İstiridye	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Faj OMN	Faj OMN istiridyenin yüzeyine uygulandığında bakteri sayısı 48 ve 72 saatte sırasıyla %90 ve %99	[74]

Günümüzde gıdalarda kullanılmak üzere faj preparatı üreten firmalar bulunmaktadır. PhageGuard (Wageningen, Hollanda) firması *Listeria*, *Salmonella* ve *E. coli* O157 gibi önemli gıda patojenlerine karşı faj solüsyonları geliştirip üretmektedirler. Geliştirilen bu ürünler FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış ürünlerdir. Benzer şekilde Intralytix (Maryland, ABD) firması gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ve *E. coli* O157 gibi patojenlere karşı sırasıyla ListShield, SalmoFresh ve EcoShield adında ürünler geliştirmişlerdir. Bu ürünler FDA tarafından onaylanmış ve kullanımı güvenli olarak kabul edilen ürünlerdir.

Kimyasal koruyucular yerine faj kullanımı gıda güvenliğinin sağlanması açısından umut vaat eden bir yöntemdir. Gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla faj kullanımının yaygınlaşması için büyük ölçekli faj üretiminin sağlanması için teknolojik yöntemlerin daha da geliştirilmesi gerekmektedir. Gıdalarda faj kullanımı ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar ve bu konuda faaliyet gösteren firmalar faj kullanımı ile gıda güvenliğinin sağlanması konusunda ciddi ilerlemeler sağlanmıştır.

#### **2.2.4. Faj ve Sinerjizm Çalışmaları**

Gün geçtikçe daha büyük bir sorun haline gelen antibiyotik direnci ve faj terapinin bu konudaki olumlu etkilerinden sonra fajların etkinliklerinin artırılması ile ilgili çalışmalar başlamıştır. Bugüne kadar çoğunlukla faj ve antibiyotik arasındaki sinerjistik etki incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada *Staphylococcus aureus* fajı ile çeşitli antibiyotikler (tetracycline, chloramphenicol, cefoxitin, polymixin, ciprofloxacin) arasında sinerjistik etki gözlemlendiği bildirilmiştir [75]. Başka bir çalışmada ise dirençli ve oportunistik patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* fajları ile antibiyotiklerin arasındaki sinerjistik etki incelenmiştir. Faj ve ceftriaxone arasında sinerjistik etki gözlenmiş ve 300 dakikalık inkübasyonun sonunda bakteri sayısında azalma olduğu bildirilmiştir [76]. Ryan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise *E. coli* biyofilmine karşı faj ve antibiyotiklerin beraber kullanılması



araştırılmıştır [77]. *E. coli* ile yapılan bir başka çalışma da faj ve ciprofloksacin'in birlikte kullanılması idrar örneklerinde 8 saat sonunda *E. coli* sayısını 7,8 log kob/mL azaltmıştır. Faj ve antibiyotik tek başına kullanıldığında ise aynı süre içerisinde bakteri sayısında sırasıyla 3,9 log kob/mL ve 1,2 log kob/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir [78]. Oportunistik patojen olan ve akciğer enfeksiyonuna neden olan *Burkholderia cepacia* fajları ve 6 farklı antibiyotiğin birlikte kullanıldığı ve aralarındaki sinerjistik etkinin araştırıldığı bir çalışmada ciprofloksacin, meropenem ve tetracycline le faj birlikte kullanıldığında faj plak büyüklüğünün ve faj titresinin arttığı gözlenmiştir [79].

Faj ile antibiyotikler arasındaki sinerjistik etkinin incelenmesinin yanı sıra antimikrobiyal özelliğe sahip diğer maddelerle olan ilişkileri de araştırılan konular arasındadır. Bu çalışmaların bir tanesinde *E. coli* O157:H7 bakterisine ait faj kokteyli ile *trans*-sinamaldehit hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanılmış olup ıspanak ve marul üzerinde bakterinin inhibisyonu amaçlanmıştır. Bakterinin 37°C'de 24 saat sonunda ayrı ayrı uygulanan faj ve sinamaldehit işlemlerinde inhibe olduğu belirtilmiş ve inoküle edilen bakteri konsantrasyonunun ve inkübasyon sıcaklığı düştükçe faj ve sinamaldehitin etkinliğinin azaldığı belirtilmiştir. Buna ek olarak faj ve sinamaldehitin birlikte uygulanması bakteri sayısını 4, 8, 23 ve 37 °C'deki sıcaklıklarda hem marul hem de ıspanak yüzeyinde tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir [80]. Chibeu ve arkadaşları tarafın dan yürütülen bir çalışmada ticari olarak bulunan *Listeria monocytogenes* bakterisinin fajlarını içeren Listex™P100 ile kimyasal antimikrobiyal maddelerle (potasyum laktat ve sodyum diasetat) birlikte kullanımı araştırılmıştır. Listex™P100 faj preparatının 4°C'de 28 gün sonunda *Listeria monocytogenes* sayısını hindi ve data etinde sırasıyla 2,1 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> ve 1,7 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> düşürdüğü belirtilmiştir. Listex™P100 faj preparatı ve kimyasal antimikrobiyallerin beraber kullanıldığında ise 28 gün sonunda 4°C'de hindi ve ette bakteri sayıları sırasıyla 4,5 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> ve 1,2 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> düşüş olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda tüketime hazır etlerin mikrobiyal güvenliğinin artırılması için kimyasal antimikrobiyallere ilaveten fajlarında kullanılabileceği belirtilmiştir [81].

### 2.2.5. Faj Terapinin Avantajları ve Dezavantajları

Fajlar sahip oldukları bazı özellikleri onları tedavi edici ajan olarak kullanılmaya uygun hale getirmektedir. Ayrıca, antibiyotiklerle kıyaslandığında birçok avantaja sahiptirler. Fajlar doğada en yaygın bulunan mikroorganizmalardandır. Fakat antibiyotiklerin birçoğu sentetik veya yarı-sentetik ürünlerdir [82]. Fajlar konakçısı bulunduğu müddetçe kendisini çoğaltabilmektedir. Konakçısına spesifik olan mikroorganizmalar oldukları için yararlı olan diğer bakterilere zarar vermemektedirler. Buna karşın antibiyotikler, geniş spektrumlu oldukları için yok edilmek istenen bakteriler dışında floradaki tüm bakterilere zarar vermektedirler [82], [83]. Antibiyotikler kullanıldıktan bir süre sonra vücuttaki konsantrasyonları bir süre sonra azalmaktadır. Fakat fajlar, konakçı bakteri var olduğu sürece çoğalmaya devam edebilmektedirler.

Fajlar keşfedildikleri tarihten buyana insanlarda görülen patojenik hastalıklarla mücadele etmek amacıyla kullanılmışlardır. Antibiyotiklerin keşfi ile birlikte her ne kadar batı ülkelerinde kullanımı azalsa da Doğu Avrupa ülkelerinde ve Sovyetler Birliği'nde kullanılmaya devam edilmiştir. Bu nedenle faj terapi alanında yapılan gelişmelerin birçoğu bu ülkelerde yapılan araştırmalardır. Bugüne kadar insanlar üzerinde faj kullanımının güvenli olup olmaması ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Fajları tedavi edici ajan olarak insanlar üzerinde ilk kullanan kişi Felix d'Herelle olmuş ve kabul edilen bir yöntem olmasa da faj güvenliğini test etmek amacıyla, faj preparatını hastaya vermeden önce kendi ve hastane çalışanları üzerinde denemiş ardından hastaya uygulamıştır. Hastalarda herhangi bir yan etki gözlenmemiş ve hastalık belirtileri kısa bir süre içerisinde yok olmuştur. Faj terapi konusundaki araştırmaların birçoğu Tiflis'te bulunan Eliava Enstitüsü'ne aittir. Eliava Enstitüsü, iltihaplı septik, bağırsak enfeksiyonları ve profilaksis tedavisi için çeşitli faj ürünleri geliştirmişlerdir. Bu ürünler oral, lokal, rektal, aerosol ve nebulözör gibi çeşitli uygulamalar ve yollarla hastalar üzerinde kullanılmıştır [82].

Fajlar insanlarda görülen enfeksiyonların tedavisinde kullanıldıklarından beri güvenli olup olmadıklarına ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Özellikle antibiyotik direncinin başlamış ile birlikte patojen bakterilerle mücadele de yeni yöntem arayışları başlamış ve faj terapi önem kazanmıştır. Bu nedenle literatürde fajların insanlarda görülen enfeksiyonlarla mücadele de kullanılması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bruttin ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada,

15 sağlıklı insana içme suyu içerisinde  $10^3$  ve  $10^5$  pfu/mL titreye sahip *E. coli* T4 fajı verilmiştir. Her iki titrede de insanlarla olumsuz bir etki gözlenmemiş, transaminaze enzim seviyesinde bir değişim gözlenmemiş olup kanda T4 fajına veya T4 fajına ait antikora rastlanmadığı bildirilmiştir [84].

## **2.3. Antimikrobiale Maddeler**

### **2.3.1. Doğal Bitki Ekstraktları**

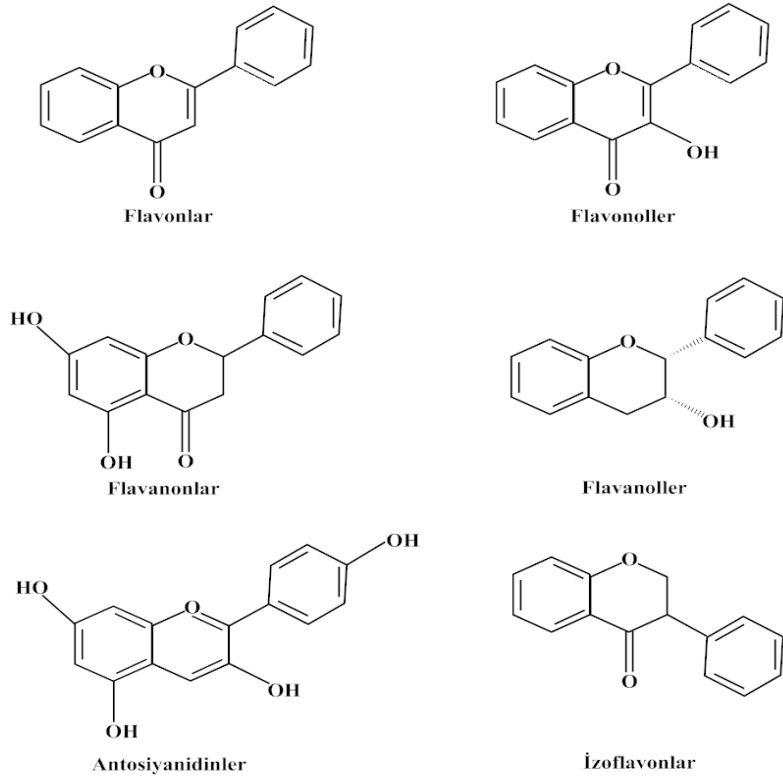
Fenolik bileşikler bitkilerde en çok bulunan ikincil metabolitlerdir. Fenolik bileşiklerin bitki yapılarında duyuusal özellikler kazandırma, yapı, tozlaşma, zararlı böceklerin ve avcılarının uzaklaştırılması, çimlenme, gelişme ve üreme gibi birçok görevi bulunmaktadır [85]. Bitkiler yüzlerce farklı fenolik madde sentezlemekte olup bu fenolik maddelerden tanımlananların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Vasküler bitkilerin yapısında hidrosinamik asitlerin esterlerini, amidlerini ve glikozitlerini, flavon ve proantosiyenin bulundurmaktadırlar. Lignin ve suberin fenolik içeren polimerlerdendir [86].

Bitki fenolikleri insan diyetinde en fazla yer alan fitokimyasallardandır. Bu nedenle, bu konuda birçok araştırma yapılmış ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğuna dair birçok veri elde edilmiştir. Nar, ayva, çay, üzüm gibi ürünlerin fenolik madde içerdikleri ve insan sağlığına yararlı oldukları literatürde sıklıkla belirtilmiştir. Örneğin nar içerisinde polifenol, antosiyenin, fenolik asitler, prosiyanidinler gibi birçok madde içermektedir [87]. Düzenli meyve ve sebze tüketiminin erken kalp ve damar hastalıklarını, kanseri, farklı kronik hastalıkları azalttığına dair kanıtlar vardır. Flavonoidler, stilbenler, kalkanlar ve bunlarla ilgili fenolik maddeler son zamanlarda sıklıkla çalışılmıştır. Bu araştırmaların temelinde fenolik maddelerin antioksidan, antiinflamatuar özelliklerinin incelenmesi ve yeni kanser ilaçlarında kullanımının araştırılması bulunmaktadır. Hastalıklara karşı koruma özellikleri ise antioksidan olma ve serbest radikalleri yakalama özelliklerinden kaynaklanmaktadır [88], [89].

Fenolik bileşikler temelde dört gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar şu şekildedir; flavonoidler, taninler, kalkanlar ve kumarinler, fenolik asitler.

*Flavonoidler*: Hidroksilasyon derecesine ve piron halkasındaki  $C_2-C_3$  çift bağlarına göre 13 gruba ayrılabilirler [85]. Flavonoidler doğada meyvelerde, sebzelerde,

tahıllarda, ağaç kabuğunda, köklerde, saplarda, çiçeklerde, çay ve şarapta yaygın olarak bulunmaktadır. Flavonoidlerin sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Farmasötik, tıbbi ve kozmetik alanlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır [90]. Fenolik bileşikler arasında flavonoidleri en güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir [85]. Flavonoidler insan sağlığını destekleyici ve hastalıkları engelliyici özelliktedir. Yapılan epidemiyolojik, klinik ve hayvan çalışmaları, flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkiler gösterebileceği ortaya konmuştur. Ayrıca flavonoidlerin antimikrobiyal, antiviral ve antiinflamatuvar etkilere de sahip oldukları bilinmektedir [91].

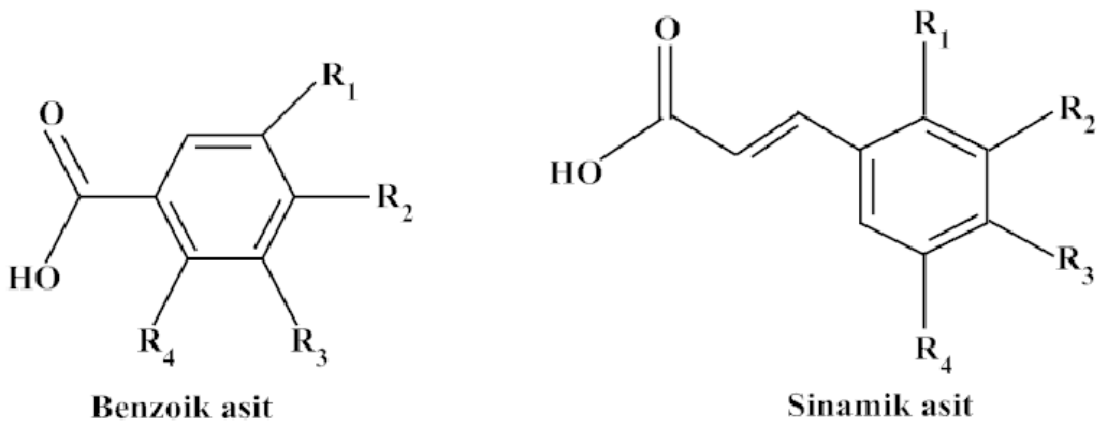


**Şekil 2.1.** Flavonoidlerin temel sınıflarının kimyasal yapıları

*Taninler*: Taninler molekül ağırlıkları 500-3000 D arasında değişen fenoliklerdir. Taninler hidrolize uğrayabilen ve hidrolize uğrayamayanlar olarak iki gruba ayrılırlar. Taninler merkezinde glikoz veya gallik asit veya heksahidroksidifenik asit

ile kısmen veya tamamen esterlenmiş polihidrik alkol içermektedir. En iyi bilinen hidroliz olabilir tannin tannik asittir. Yoğunlaşmış tanenler, asit muamelesi ile kolayca hidrolize edilmeyen kateşin veya lökoantosiyanidin polimerleridir. Sebzelere buruk tadı veren fenolik fraksiyonu oluşturur. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda besin alımı, büyüme hızı, besin etkinliği, metabolize edilebilir enerji ve protein sindirilebilirliğini azalttığı bildirilmiştir. Taninler flavonoidlere kıyasla daha az antioksidan aktiviteye sahiptirler. Yapılan araştırmalarda antioksidan aktivitesinin polimerizasyon derecesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [85], [92].

*Kalkonlar ve kumarinler.* Kalkonlar flavonoidlerin sentezinde oluşan ara ürünlerdir. Yapılan çalışmalar kalkonların koruyucu ve fonksiyon düzenleyici etkisi olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle kalkonların tedavi edici ajan olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir [85], [88]. Kumarinler sinamik asit türevi olan ikincil metabolitlerdir. Bu maddeler doğada umbelliferone, esculetin ve scopoletin gibi glikozitler olarak ve çoğunlukla zeytinyağı, yulaf ve baharatlarda bulunur [85].



**Şekil 2.2.** Benzoik asit ve Sinamik asitin kimyasak yapıları

*Fenolik asitler.* Fenolik asitler fenolik halka ve en az bir karboksilik asit içeren fenol grubudur. Fenolik asitler benzoik asit, sinamik asit ve bunların türevleri şeklinde iki gruba ayrılabilir. Yedi karbon atomuna sahip olan benzoik asitler doğada bulunan en basit yapıli fenolik asitlerdir. Sinamik asitler dokuz karbonludur. Fakat

meyve ve sebzelerde yaygın olarak yedi karbon atomuna sahip olan formları mevcuttur. En çok bilinen benzoik asitler protokatejik asitler, vanillik asitler, gentisik asit, salisilik asit, p-hidroksibenzoik asit ve gallik asittir. Doğada en yaygın olarak bulunan sinnamik asitler ise p-kumarik, ferulik, kafeik ve sinapik asittir. Fenolik asitler ve esterleri yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bunlar arasında en çok bilinenler ise hidroksibenzoik asit, hidroksisinnamik asit, kafeik asit ve klorojenik asittir [85], [93]. Fenolik asitler gıdanın renk özelliklerini, duyuusal özelliklerini, besinsel ve antioksidan özelliklerini etkilemektedir [94].

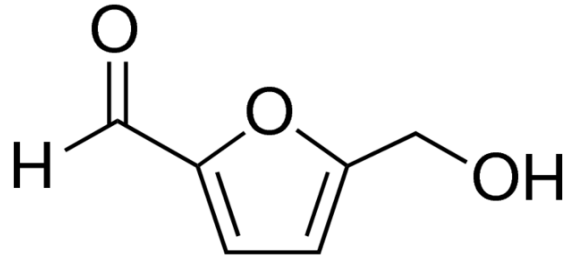
### 2.3.2. Pekmez

Pekmez ülkemizde sıklıkla tüketilen ürünlerden biridir. Karbonhidrat, organik asit, mineral ve kısmen vitamin içeriği yüksek bir üründür [95]. Elma, keçiyoynuzu, karpuz, üzüm, şeker pancarı, dut gibi çeşitli meyvelerden üretilebilir ve yüksek miktarda şeker içeren meyvelerin kaynatılmasıyla elde edilebilir [96], [97]. Pekmez üretimi kullanılan hammaddeye göre değişebilir. Bileşimdeki maddeler nedeniyle, pekmez, insan beslenmesi için önemli bir gıda ürünü olarak kabul edilir. Genellikle meyve önce yıkanır, sonra 20-30 kg meyveye 8-10 litre su eklenir ve bu karışım bir saat kaynatılır. Kaynatıldıktan sonra, ürün 40-50°C'ye soğutulur, preslenir ve süzülür, sonra buharlaştırılarak konsantre edilir. 65-72 °Brix'e sahip son ürün, oda sıcaklığında paketlenir ve depolanır [97], [98].

Pekmezin reolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri gıda endüstrisi için önem taşımaktadır. Literatürde çeşitli çalışmalarda farklı pekmez çeşitlerinin toplam şeker değeri, mineral içeriği, toplam fenolik içeriği, HMF içeriği, invert şeker ve protein içeriği gibi kimyasal özellikleri; viskozite, renk gibi fiziksel ve reolojik özellikleri araştırılmıştır [96], [97], [99]–[101]. Kamışlı ve arkadaşları pekmezin viskozite değerlerinin farklı sıcaklık ve brix değerlerinde 0-93 s<sup>-1</sup> arasında bulmuşlardır [97]. Literatürde farklı pekmez örneklerinin toplam şeker değerleri 60,22 g/100g (dut) [96]; 62,80 g/100g (keçiyoynuzu) [101]; 62,16-68,79 g/100g (keçiyoynuzu pekmezleri) [102]; 64,13 g/100g (üzüm), 60,12 g/100g (dut), 64,11 g/100g (keçiyoynuzu) [103] olarak bulunmuştur. Tüm pekmez türleri için glikoz ve früktoz en fazla bulunan şekerlerdir. Üzüm ve dut pekmezinde sakaroz miktarı çok

düşüktür çünkü kaynatma sürecinde neredeyse tamamen hidrolize uğramaktadır. Fakat keçiyoynuzu pekmezindeki sakaroz miktarı daha fazladır [103]–[106].

Pekmez taze meyveden üretilen bir üründür. Bu nedenle içeriğinde meyveden gelen fenolik maddeler bulunmaktadır.



**Şekil 2.3.** HMF'nin molekül yapısı

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları pekmezde önemli bir kalite problemidir. Pekmezde yüksek şeker içeriğinden dolayı esmerleşme ve karamelizasyon meydana gelmektedir. Şekerlerde bulunan karbonil grupları ile amino asitlerde bulunan amino grupları arasında meydana gelen reaksiyon maillard reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu reaksiyon amino asitler ile lipit oksidasyonu ürünleri arasında da meydana gelebilmektedir. Maillard reaksiyonu ürünleri spesifik renk ve aroma oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar [107]. Pekmezde oluşan HMF miktarı Maillard reaksiyonlarının indikatörü olarak kabul edilmektedir. HMF pekmez için önemli bir kalite parametresi olup oluşumu proses şartları, depolama süresi, şeker bileşimi, pH, toplam asitlik, mineral içeriği gibi etkenlerle yakından ilgilidir [103], [108].

### 2.3.3. Propolis

Propolis bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından ağaç ve bitkilerin tomurcuklarından toplandıktan sonra arılar tarafından salgılanan enzimlerle ve polen ile karıştırılan, güçlü bir yapışkan olan maddedir. Arılar propolisi kovanın iç duvarını korumak ve pürüzsüzleştirmek için kullanmaktadır [109]–[111]. Propolisin genel yapısında %50

oranında reçine ve bitkisel balsam, %30 oranında mum, %10 oranında temel ve aromatik yağlar, %5 oranında polen ve %5 oranında da diğer bileşiklerden bulunmaktadır [109], [110]. Propolisin içerisindeki mum ve organik atıklar etanol ekstraksiyonu ile uzaklaştırılmakta ve biyoaktif bileşenlerden oluşan propolis elde edilmektedir. Propolis içerisinde polifenol, terpenoid, steroid, şeker ve amino asitlerinde bulunduğu 300'den fazla bileşen içermektedir. Bu bileşiklerin dağılımı propolisin elde edildiği jeografik koşullara göre değişmektedir [109], [112]–[114].

Propolis antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör, antimutajenik olma gibi pek çok özelliği bulunmaktadır [109], [110], [112]–[115]. Choi ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırma da iki farklı bölgeden izole edilen propolisin *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bütün etanol ekstraktı olan propolis örnekleri *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etki göstermiştir [116]. Silva ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada propolisin antimikrobiyal ve iltihap oluşumunu engellemesi üzerine olan etkisi incelenmiştir. En yaygın patojenlerden olan *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Staphylococcus aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda propolisin antibiyotik dirençli suşlara ve oluşabilecek iltihaplara karşı kullanılabileceği bildirilmiştir [117]. Yapılan bir başka çalışmada ise propolis ekstraktlarının antiviral etkileri araştırılmış ve farklı propolis örneklerinin kuş gribi virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir [114]. Yıldırım ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırma da propolisin iki farklı uçuk virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği belirtilmiştir [118].

Propolisin anti-inflamatuvar (iltihaplanmayı önleyici) etkisi olup olmadığı birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Santiago ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, propolis ve klorheksidin içeren diş ürünlerinin insan monositleri üzerine olan etkisini incelemiştir. Bulgular, propolis ve klorheksidin kombinasyonu antijenlerin monositler tarafından tanınmasını arttırmış ve insan monositlerinin *Streptococcus mutans*'a karşı olan bakterisidal aktivitesini arttırdığını bildirmiştir. Ayrıca bu kombinasyonun diş hastalıkları tedavisinde önemli bir fayda sağlayan antiinflamatuvar stokinlerin üretimini de arttırmıştır [119]. Yapılan bir çalışmada



propolisin etanol ve su ekstraktlarının fare modelleri üzerinde antienflamatuvar etkisi araştırılmış ve her iki ekstraktın da antienflamatuvar etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [120].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteri ve Faj

Bu çalışmada kullanılan bakteriyofaj George Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü'nden (Tiflis, Gürcistan) alınmıştır. *E. coli* O157: H7; Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'dan (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) sağlanmıştır.

##### 3.1.2. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

CASO Broth, Agar ve gliserol Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Gliserol bakteri ve faj stoklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında kullanılan bakteri ve fajların stoklarının hazırlanmasında, bakteriye özgü fajın izolasyonu, zenginleştirilmesi, titrelerinin belirlenmesinde, pekmez örneklerinin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesinde ve faj-pekmez arasındaki sinerjistik etki olup olmadığının belirlenmesinde CASO broth, CASO yumuşak agar (%0,6) ve CASO agar (%1,5) kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan üzüm çekirdeği, ayva ve nar kabuğunun ekstraksiyonu ve propolisin ekstraksiyonu için kullanılan etanol, metanol ve aseton Merck Millipore Corporation'dan temin edilmiştir. Bitki ekstraktları, pekmez örnekleri ve propolisin toplam fenolik madde analizinde kullanılan Folin- Cioacaltea reaktifi ve sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

##### 3.1.3. Fenolik Bileşikler ve Pekmez Örnekleri

Fenolik madde ekstraksiyonu amacıyla kullanılan ayva ve nar Ankara'da bulunan yerel marketlerden, üzüm çekirdekleri ise Kavaklıdere şarapları A.Ş.'den temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan dut pekmezi (DP), karadut şurubu (KD) ve keçiyoynuzu pekmezi (T) geleneksel üretim ile elde edilen örneklerden paçal yapılarak hazırlanmıştır. Keçiyoynuzu pekmezi (KBM) ve üzüm pekmezi (ÜP) örnekleri ise yerel marketten temin edilen örneklerden paçal yapılarak hazırlanmıştır. Propolis

örneği ise Dr. Öğr. Üyesi Serap Duraklı Velioglu'ndan (Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) temin edilmiştir.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Faj İzolasyonu, Saflaştırma ve Zenginleştirme**

#### **3.2.1.1. Faj İzolasyonu**

*E. coli* O157:H7 fajının izolasyonunda Eliava Enstitüsünden alınan faj miksleri kullanılmıştır. Faj izolasyonu için, ticari preparatlardan 10 µl faj karışımları alınıp ve steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra 10 µl *E. coli* O157: H7 bakteri suşu, Eppendorf'a ilave edilmiş ve fajın bakteriye absorbe olması için oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 1 mL'lik bir son hacim elde etmek için steril CASO broth ilave edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, Eppendorf tüpleri hücre kalıntılarının giderilmesi için 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonra süpernatant başka bir steril Eppendorf tüpüne toplanmış, pelet atılmıştır. *E. coli* O157:H7 faj sayılarının artması için bu prosedür üç kez yapılmıştır.

#### **3.2.1.2. Fajın Saflaştırılması**

İzolasyonu yapılan fajların saflaştırılması için tek plak izolasyonu yapılmıştır. Fajların dilüsyonları serum fizyolojik (FTS; %0,85 NaCl) çözeltisinde hazırlandıktan sonra faj dilüsyonlarından 100 µl ve konakçı bakterinin logaritmik fazdaki kültüründen 150 µl alınarak 3 mL'lik steril yumuşak agara eklenir ve CASOagar üzerine dökülerek homojen bir şekilde yayılması sağlanır. 18-24 saatlik bir inkübasyonun sonunda agar üzerine tek düşen plaklardan alınarak Eppendorf tüpünün içine aktarılmıştır. Tüpün içerisine 100 µL besiyeri eklenerek fajların sıvı besiyerine geçmesi sağlanır. Logaritmik fazdaki konakçı kültürden Eppendorfa 10 µL kültür eklenir ve faj ile bakterinin adsorpsiyonu için oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Adsorpsiyonun ardından besiyeri ile üzeri 1 mL'ye tamamlanmış ve 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücre artıklarının uzaklaştırılması amacıyla 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süpernatant steril bir Eppendorf tüpüne alındıktan sonra 0,45 µm porlu filtrelerden (Sartorius, Almanya)

geçirilmiştir. Fajların saflığından emin olmak için bu işlem üç kez tekrarlanmıştır [121].

### **3.2.2. Doğal Bitki Ekstraktları**

#### **3.2.2.1. Fenolik Madde Ekstraksiyonu**

Taze üzüm çekirdekleri 45°C'de 2 gün boyunca etüvde kurutulmuş ardından öğütücü yardımıyla öğütülmüştür. Ekstraksiyon işlemi için öğütülmüş üzüm çekirdeklerine 1:10 (w/v) oranında %50 etanol-su karışımı eklenmiştir. Bu karışım 200 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılmış ve karışım kaba filtre kağıdı yardımıyla süzölmüştür. Süzöntü kısmı alındıktan sonra kaba filtre kağıdında kalan kısma tekrar aynı oranda etanol-su karışımı eklenmiş ve tekrar karıştırmaya bırakılmıştır. Bu karışım kaba filtre kağıdından süzölmüştür. İki süzöntü karıştırılmış ve rotary evaporatörde çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Oksidasyonun önlenmesi amacıyla ekstraktlar azot gazı ile muamele edilmiş daha sonra -18°C'de depolanmıştır [122].

Nar ekstraksiyonu için nar kabukları soyulmuş, liyofilizatörde dondurularak kurutulmuş ve öğütülmüştür. Öğütülmüş nar kabuklarının üzerine üzüm çekirdeklerinin ekstraksiyonunda kullanılan ile aynı oranda etanol-su karışımı eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 4 saat boyunca 200 rpm'de karıştırmaya bırakılmıştır. Karıştırma süresinin sonunda karışım kaba filtre kağıdından süzölmüş ve rotary evaporatörde çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Ekstrakt -18°C'de depolanmıştır [122].

Ayva ekstraksiyonu için ayvanın çekirdekleri çıkarılmış ve liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Kurutulan örnekler öğütücüden geçirilerek öğütülmüştür. Bir önceki ekstraksiyon yöntemlerinde kullanıldığı gibi etanol-su karışımı eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca 200 rpm'de karıştırmaya bırakılmıştır. Karışım kaba filtre kağıdından süzöldükten sonra rotary evaporatörde çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Ekstrakt -18°C'de depolanmıştır [122].

### **3.2.2.2. Doğal Bitki Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi**

Elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları spektrofotometrik bir yöntemle belirlenmiştir. 100 µL örnek, 8,4 mL saf su ve 500 µL Folin–Ciocalteu çözeltisi eklenmiştir. 3 dakika bekletildikten sonra üzerine hazırlandıktan sonra bir gece karanlıkta bekletilen %35'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 1 mL eklenip vorteks ile karıştırılmıştır. Karışım bir saat boyunca karanlıkta bekletilmiştir. 1 saat sonunda karışımın 760 nm'deki absorbanans değeri Agilent 8453 UV–Visible spektrofotometre (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) ile ölçülmüştür. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanması için 200-1000 ppm arasında gallik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı hazırlana kalibrasyon grafiğinden elde edilmiş ve sonuçlar mg gallik asit/l olarak verilmiştir [123].

### **3.2.3. Pekmez Örneklerinin Analizleri**

#### **3.2.3.1. HMF Miktarının Belirlenmesi**

Hidroksimetilfurfural (HMF) içeriği Winkler yöntemine (1955) göre belirlenmiştir. Prosedür ayrıca Uluslararası Bal Komisyonu (IHC 2002) tarafından ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Analiz, kırmızı renkli bir kompleks oluşturan barbiturik asit, p-toluidin ve HMF arasındaki kolorimetrik reaksiyona dayanmaktadır. Kırmızı renkli çözeltilerin 550 nm'de emilimi, bir UV-Vis spektrofotometresi (UV-2600, SHIMADZU, JAPAN) kullanılarak belirlenmiştir. Gerektiğinde numune çözeltileri seyreltilmiş ve seyreltme faktörü dikkate alınmıştır. HMF'nin kantitatif değeri, yöntem için önerilen formül kullanılarak belirlenmiştir [124].

#### **3.2.3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi**

Pekmez örneklerinin fenolik içeriğinin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır [125]. İlk önce, 0,1 g numune tartılmış ve 10 mL damıtılmış su kullanılarak seyreltilmiştir. Çözelti, bir multi-vorteks (Multi Reax, Heidolph, ALMANYA) kullanılarak karıştırılmış ve Whatman No 1 filtre kağıdından süzölmüştür. 20 µL numune ekstresi (veya standart çözelti) ve 1580 µL distile su, bir cam tüpte ve 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildikten sonra ve vorteks

(Reax top, Heidolph, ALMANYA) kullanılarak karıştırılmıştır. Daha sonra 300 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) çözeltisi ilave edilmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Test tüplerindeki karışımlar, 40°C'de 30 dakika boyunca su banyosunda (WiseBath, DAIHAN Scientific, KOREA) inkübasyona bırakılmıştır. Yeşil-mavi kompleksin Emilimi, 765 nm'de UV-Vis spektrofotometre (UV-2600, SHIMADZU, JAPAN) ile köre (numune yerine 20 mL su kullanılarak hazırlandı) karşı okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L) standart çözeltilerden, 1000 mg/L konsantrasyonda gallik asit stok çözeltisinden hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi üretilmiştir. Sonuçların hesaplanmasında bu kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Sonuçlar, g numune başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir [126].

### **3.2.4. Propolis**

#### **3.2.4.1. Propolis Ekstraksiyonu**

Propolis ekstraksiyonu Chen ve arkadaşları tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [127]. 10 g örnek %95'lik etanolde 250 rpm'de 25°C'de 48 saat ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrakt Whatman no.4 filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtreden geçirilen ekstraktın üzeri çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

#### **3.2.4.2. Propolis Örneğinden Fenolik Ekstraksiyonu**

Fenolik ekstraksiyonu Oruç ve arkadaşlarının kullandığı yöntem ile değişiklikler yapılarak uygulanmıştır [128]. 1 g propolis örneği 20 mL %70'lik etanol kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra 15 dakika boyunca ultra sonikasyon işlemi yapılmıştır. Propolis ekstraktı Whatman (No.1) filtre kağıdı ile filtre edilmiş ve 40°C, 200 rpm'de rotary evaporatör kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Kurutulmuş ekstrakt, 2 mL metanol içerisinde çözdürülmüş ve kullanılabildiği kadar 4°C'de saklanmıştır. Fenolik bileşen tayini için metanolde çözdürülmüş ekstraktan dilüsyonlar hazırlanmış ve analiz yapılmıştır.

### 3.2.4.3. Propolisin Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Toplam fenolik analizi Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılmıştır [125]. Örnekler analizlerde kullanılmak üzere 250 kat seyreltilmiştir. Örnek ekstraktan 20 µL alınarak 1580 µL distile su ve 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmıştır. 300 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) eklenerek tekrar karıştırılmıştır. Tüpler 40°C'de 30 dakika su banyosunda (WiseBath, DAIHAN Scientific, KOREA) inkübasyona bırakılmıştır. Kör solüsyonu örnek yerine 20 µL saf su eklenerek hazırlanmıştır. Örneklerin absorbans değerleri UV-Visible spektrofotometre (UV-2600, SHIMADZU, JAPAN) ile 765 nm'de ölçülmüştür. 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında standart çözeltilerin hazırlanması için bir stok gallik asit çözeltisi (1000 mg/L) kullanılmıştır. Standart çözeltilerin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi üretilmiş ve bu kalibrasyon eğrisi örneklerin fenolik madde içeriklerinin hesaplanması için kullanılmıştır. Sonuçlar, g numunesi başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.5. Doğal Bitki Ekstraktlarının, Pekmez Örneklerinin ve Propolisin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesi için beş farklı pekmez ve 3 adet ekstrakt (nar, üzüm, ayva) kullanılmıştır. Öncelikle, CASO agar ortasına 20 µl pekmez ve ekstrakt numuneleri damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. 300 µL *E. coli* O157: H7 (OD<sub>600</sub> = 0,5-0,6) 4 mL yumuşak agar içine aktarılmış ve hafifçe karıştırıldıktan sonra agar üzerine yayılmıştır. Agar , inhibisyon zonunun gözlemlenebilmesi için 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir [129]. İnkübasyon sonunda agar üzerinde inhibisyon zonlarının olup olmadığı gözlenmiştir.

Bitki ekstraktları ve pekmez örneklerinin agar plakaları üzerindeki antimikrobiyal etkileri belirlendikten sonra, etkinin daha net ortaya koyulabilmesi amacıyla sıvı ortamında antimikrobiyal etki araştırılmıştır. Bu amaçla Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ve Minimum Bactericidal Concentration (MBC) değerleri belirlenmiştir. MIC ve MBC değerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır [130]. Beş farklı pekmez örneği kullanılmış ve orijinal pekmez örnekleri "d", bir kat seyreltilmiş pekmez örnekleri "d/2" olarak adlandırılmıştır. Aynı şekilde diğer seyreltilmiş pekmez örnekleri (d/4, d/8, d/16) da hazırlanmıştır.

Pekmez, log-fazındaki bakteri kültürü ( $OD_{600} = 0,5-0,6$ ) ve sıvı besiyeri her ELISA plaka kuyucuğuna eklenmiş olup ELISA plaka kuyucuklarının son hacmi aynı olacak şekilde ayarlanmıştır. Kontrol grupları için pekmez bulunmayan bakteri kültürü ve bakteri kültürü olmayan pekmez örnekleri de kullanılmış ve ELISA plaka kuyularına eklenmiştir. Mikroplakalar,  $37^{\circ}C$ 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler Eppendorf tüplerine toplanarak bakteri sayımı için kullanılmıştır.

Propolis örneğinin antimikrobiyal etkisinin tespit edilmesi amacıyla agar ortamı denemesi yerine sıvı ortam denemesi yapılmış ve MIC, MBC değerleri belirlenmiştir. MIC ve MBC değerleri belirlenirken yukarıda belirtilen yöntem uygulanmıştır kontrol denemesi amacıyla aynı oranda etil alkol hazırlanmış ve propolis yerine kullanılmıştır [130].

### **3.2.6. Bitki Ekstraktları, Pekmez Örnekleri ve Propolisin Faj Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi**

Bitki ekstraktları ve pekmez örneklerinin faj ile etkileşiminin araştırılması amacıyla öncelikle agar ortamında fenoliklerin ve pekmez örneklerinin faj plak boyutlarına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 50  $\mu L$  pekmez numuneleri (d/2, d/4, d/8, d/16) agar üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. 150  $\mu L$  bakteri kültürü ( $OD_{600} = 0,5-0,6$ ) ve  $10^2-10^3$  pfu/mL titre ile 100  $\mu L$  faj, 4 mL eritilmiş yumuşak agar içerisinde karıştırılmıştır. Karışım, agar üzerine yayılmış ve  $37^{\circ}C$ 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, difüzyon bölgesinde plak oluşumu incelenmiştir. Aynı şekilde nar, üzüm ve ayva ekstraktlarından d, d/2 ve d/4 konsantrasyonların da örnekler hazırlanmıştır. Agar üzerine 50  $\mu L$  damlatma yapılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra üzerine aynı şekilde yumuşak agar ile kaplanmış ve inkübasyona bırakılmıştır [131].

Propolis örneğinin *E. coli* O157:H7 fajlarına olan etkisinin anlaşılabilmesi amacıyla agar ortamında faj plakları gözlenmiştir. Bunun için 4 ml'lik yumuşak agarın içerisine 100  $\mu L$  faj, 150  $\mu L$  gelişme fazındaki bakteri ve propolis örneği eklenmiş ve önceden hazırlanan agar petri üzerine yayılmıştır. Propolis örnekleri son hacimdeki konsantrasyonları d/4, d/8, d/16 ve d/32 olacak şekilde ayarlanmıştır.



Kontrol olarak ise %95'lik etanol hazırlanmıştır. Hazırlanan etanol propolisin yerine d/4, d/8, d/16 ve d/32 son konsantrasyonlarında yumuşak agara eklenmiştir. Ayrıca yalnızca fajda kontrol olarak kullanılmıştır. Petriler bir gece 37°C'de inkübe edilmiş ve ertesi gün faj titreleri ve plak boyutları gözlenmiştir.

### **3.2.7. Faj ile Pekmez Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi**

#### **3.2.7.1. Faj-Pekmez Etkileşiminin Sıvı Ortamda İncelenmesi**

Yalnızca pekmez, yalnızca faj ve bunların kombinasyonunun *E. coli* O157:H7'ye karşı olan antimikrobiyal etkisinin sıvı ortamda belirlenebilmesi amacıyla zaman ölüm eğrisi (Time kill curve) deneyi yapılmıştır [132]. MOI değeri 0,1'e ayarlanmıştır. Sadece bakteri ( $10^7$  kob/mL), pekmez ve bakteri (MIC,  $10^7$  kob /mL; MIC/2,  $10^7$  kob/mL), bakteri ve faj ( $10^7$  kob/mL bakteri,  $10^7$  pfu/mL faj), pekmez, faj (MIC,  $10^7$  kob/mL bakteri,  $10^7$  pfu/mL faj; MIC/2,  $10^7$  kob/mL bakteri,  $10^7$  pfu/mL faj) TSB'de hazırlanmış ve 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında, 0, 30, 60, 90, 120, 240 ve 300 dakikalarda steril Eppendorf tüplerine 100 µL örnek alınmıştır. Örnekler, bakteri hücre artıklarının uzaklaştırılması amacıyla 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiştir. Süpernatant steril Eppendorf tüplerine alınmış ve bu supernatant faj titresi belirlemesi için kullanılmıştır. Bakteri hücrelerinden oluşan pelet steril serum fizyolojik (%0,85) ile yeniden süspansiyon edilmiş ve EMB agarda bakteriyel sayım için kullanılmıştır.

#### **3.2.7.2. Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi**

Agar ortamında yapılan denemelerde pekmez örneklerinin faj plak büyüklüklerinin arttırdığı görülmüştür. Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmış ve tp3 fajının pekmez (T) varlığında ve yokluğunda latent dönemleri ve patlama büyüklükleri elde edilmiştir. Gelişme eğrisi Reyes-Gavilan vd. (1990) ve Suarez vd. (2002) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir [133], [134]. Tek aşamalı gelişme eğrisi d/4 (MIC) ve d/8 ( $\frac{1}{2}$  MIC) konsantrasyonlarında elde edilmiştir. MOI değeri 0,1 olarak ayarlanmıştır. Faj-bakteri-pekmez (Pekmez son konsantrasyonu d/4 ve d/8 olacak şekilde hazırlanmıştır.) karışımları hazırlanmış daha sonra adsorpsiyon için 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağlanmayan fajların

uzaklaştırılması amacıyla 12 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant atılmış, pelet TSB besiyeri ile tekrar çözdürülmüştür. 120 dakikalık inkübasyon boyunca belirli aralıklarda örnekler alınmış, 12 500 rpm'de 2,5 dakika santrifüj edilmiş ve faj titresi belirlenmiştir.

### **3.2.7.3. Faj Duyarlılığının Belirlenmesi**

Agar ortamında yapılan denemeler sonucunda pekmez örneklerinin belirli konsantrasyonlarının faj plak büyüklüklerinin arttırdığı belirlenmiştir. Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için sıvı ortam denemelerine geçilmiştir. Bu denemeler için T pekmez örneği ve tp 3 fajı seçilmiştir. Fajın pekmez bulunan ortamdaki dayanıklılığının veya pekmezin faj üzerine olabilecek antiviral etkisinin belirlenmesi amacıyla faj duyarlılık testi yapılmıştır. Bu amaçla T pekmezi d, d/2 ve d/4 konstrasyonlarında CASO broth yardımıyla hazırlanmıştır. MOI değeri 0,01 olarak ayarlanmıştır. Denemeler 2×MIC (d/2), MIC (d/4) ve 1/2×MIC (d/8) değerleri için yapılmış ayrıca birde pekmez içermeyen kontrol eklenmiştir. Tüm değerler için üç paralel ile çalışılmıştır. Öncelikle 100 µl faj ve 100 µl bakteri Eppendorfa eklenir ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından üzerlerine sıvı besiyeri ve pekmez örneği eklenmiş ve 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmış ve uygun dilüsyonlar hazırlanarak faj titreleri belirlenmiştir [130].

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Faj İzolasyonu

*E. coli* O157:H7 bakterisine ait fajlar Eliava Enstitüsü'nden temin edilen faj karışımlarından izole edilmiştir. Bakteri faj karışımları inkübasyona bırakılmış ve üreme göstergesi olan bulanıklık takip edilmiştir. Bulanıklığa göre konakçı bakteri miktarı artırılmış veya sabit tutulmuştur. Bu işlemler sonunda çift tabaka agar yöntemi ile faj varlığı tespit edilmiştir. Varlığı tespit edilen fajlardan tek koloni izolasyonu yapılmış ve zenginleştirme işlemi yapılmıştır. İzole edilen fajlar morfolojik özelliklerine göre sırasıyla isimlendirilmiştir. İzole edilen fajlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** İzole edilen *E. coli* O157:H7 fajları

BAKTERİ	FAJ
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7 tp1
	<i>E. coli</i> O157:H7 tp2
	<i>E. coli</i> O157:H7 tp3
	<i>E. coli</i> O157:H7 tp4
	<i>E. coli</i> O157:H7 tp5
	<i>E. coli</i> O157:H7 tp6

Zenginleştirme işlemleri tamamlandıktan sonra fajlar %50'lik gliserol ile karıştırılarak stoğa alınmıştır. Stoklar -18°C'de depolanmıştır.

### 4.2. Fenolik Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik değerleri spektrofotometrik bir yöntemle belirlenmiştir. Ekstraktların toplam fenolik madde değerleri hazırlanan gallik asit kalibrasyon eğrisi yardımıyla belirlenmiş ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Narın en yüksek fenolik madde değerine sahip olduğu saptanmıştır. Literatürde çeşitli çalışmalarda nar kabuğundaki fenolik madde değerleri araştırılmıştır. Elfalleh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada nar kabuğu, yaprakları, tohumu ve

çiçeğinin toplam fenolik madde içerikleri araştırılmıştır. Çalışmada nar kabuğunun toplam fenolik madde içeriği 85,60 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur [135].

**Çizelge 4.2.** Doğal bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri

<b>EKSTRAKTLAR</b>	<b>Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g)</b>
Nar	330,00
Üzüm	66,02
Ayva	16,90

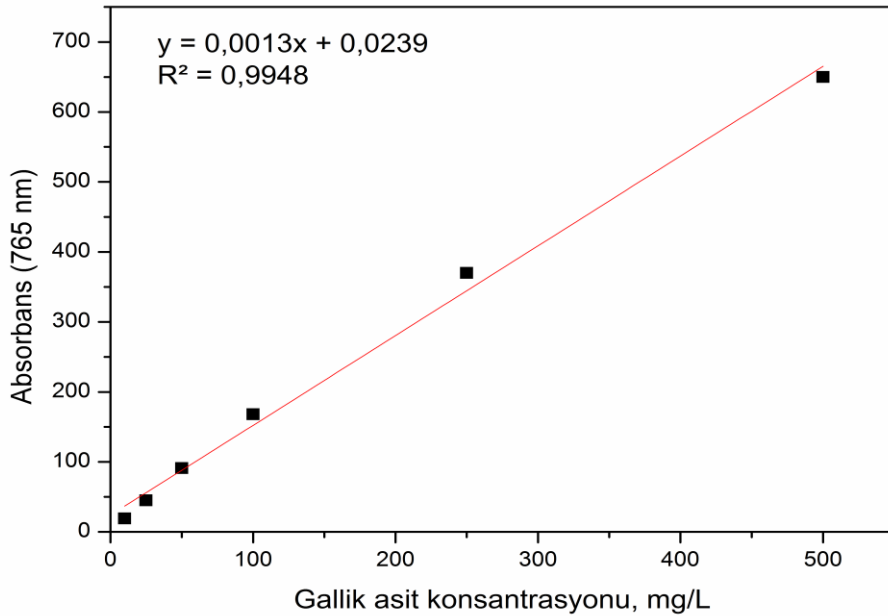
Üzümdeki fenolik madde değeri 66,02 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur. Literatürde üzüm çekirdeğinin toplam fenolik madde miktarını araştıran çalışmalar incelendiğinde bizim değerimize yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada üzüm çekirdeklerinin katı-sıvı ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiş ve katı- sıvı oranlarının, çekirdek partikül büyüklüklerinin ekstraksiyona olan etkisi incelenmiştir. Üzüm çekirdeğinin en yüksek toplam fenolik değeri 66,80 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur [136]. Bir diğer çalışmada ise Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak toplam fenolik miktarı belirlenmiş fakat sonuçlar mg of klorojenik asit/g kuru madde olarak verilmiştir. Üzüm çekirdeğinin toplam fenolik madde miktarı 63,5 mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir [137].

#### **4.3. Pekmez Örneklerinde HMF, Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi**

Pekmez örneklerinin HMF değerlerinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır. HMF miktarı bal ve pekmez gibi bazı gıdalarda Maillard reaksiyonları ve esmerleşme reaksiyonlarının indikatörü olarak kabul edilmektedir [138]. KBM, DP, T, ÜP ve KD pekmezlerinin HMF değerleri sırasıyla 8,6; 170,9; 353,3; 15,6 ve 4072,3 mg/kg olarak bulunmuştur. Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada üzüm pekmezi ve dut pekmezinin HMF içerikleri sırasıyla 46,0 mg/kg ve 96,9 mg/kg olarak bulunduğu belirtilmiştir [139]. Tetik ve

arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise keçiyoynuzu pekmezinin HMF içeriği 12,25 mg/kg olarak bulunmuştur [101]. HMF, ısı işlem sonucu oluşan Maillard reaksiyonlarının ana ürünlerinden biridir. Şekerler ve amino asitler arasında meydana gelen reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır. Pekmezde HMF oluşumum toplam şeker miktarı, aminoasit miktarı, ısı işlem süresi, pH, su aktivitesi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim göstermektedir. DP, T ve KD pekmez örnekleri geleneksel yöntemle üretilen örneklerdir. Üretimindeki sıcaklık ve diğer ortam şartları kontrollü olmadığı için HMF miktarları oldukça yüksek bulunmuştur.

Toplam fenolik içeriği pekmez örneklerinin antimikrobiyal etkisini değerlendirmek için önemli parametrelerdir. Pekmez örneklerinin toplam fenolik bileşiklerinin miktarları Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Fenolik madde analizi yapılırken 10-500 mg/L aralığında farklı konsantrasyonlara sahip gallik asitin 765 nm'de absorban ölçümü alınmış ve bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Örneklere ait toplam fenolik madde miktarları kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiği Şekil 4.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Gallik asitin kalibrasyon grafiği

KBM, DP, T, ÜP ve KD örneklerinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 11,73; 10,95; 11,82; 9,21 ve 1,73 mg GAE/g şeklinde belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik içeriği, 11,82 mg GAE/g olan T numunesine aittir. T ve KBM örneklerinin her ikisi de keçiboynuzundan elde edilen pekmez örnekleridir ve toplam fenolik miktarları birbirine yakın çıkmıştır. Akkaya ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada keçiboynuzu pekmezindeki toplam fenolik miktarı 16,54 mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir [140]. Tetik ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise keçiboynuzu pekmezinin toplam fenolik miktarı 1,62 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur [101]. DP ve KD örneklerinin toplam fenolik madde miktarları ise sırasıyla 10,95 ve 1,73 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Kamiloğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada taze dut, dut pekmezi ve dut şurubunun fenolik madde miktarları sırasıyla 1451,4 mg GAE/100g, 402,4 mg GAE/100g ve 25,0 mg GAE/100g kuru madde olarak bulunmuştur [141]. Bir başka çalışmada ise beyaz dut pekmezinin ve kara dut pekmezinin toplam fenolik madde miktarları 2,86 mg GAE/g ve 4,66 mg GAE/g kuru madde olarak bulunduğu belirtilmiştir [100]. Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise üç farklı dut pekmezinin toplam fenolik içerikleri 138, 189 ve 199 mg GAE/100 g olarak bulunduğu belirtilmiştir [139]. ÜP örneğinin toplam fenolik madde miktarı 9,21 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Literatürde yapılan çalışmalarda üzüm pekmezinin toplam fenolik madde miktarları 1,25 mg GAE/g kuru madde [100], 54,61 mg GAE/ d kuru madde [142] olarak bulunduğu belirtilmiştir. KBM, DP, T ve ÜP örneklerinin toplam fenolik içerikleri birbirine yakınken ÜP örneğinin toplam fenolik miktarı diğerlerinden daha düşük bulunmuştur. Alasalvar ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, pekmezin toplam fenolik madde miktarı 1444 mg/100 g olarak bulunmuştur [143]. Pekmezdeki toplam fenolik madde miktarındaki değişim üretildiği meyveden gelen fenolik maddelerle yakından ilgilidir. Kullanılan meyvedeki fenoliklerin değişimi ise meyvenin cinsine, üretildiği yerin coğrafik koşullarına ve meyvenin genetik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir [144]. Bu nedenle literatürde bulunan toplam fenolik madde sonuçları farklılık göstermektedir.

**Çizelge 4.3.** Pekmez örneklerine ait toplam fenolik (TP) ve hidroksimetilfurfural (HMF) değerleri

Pekmez Örnekleri	TP (mg GAE/g)	HMF (mg/kg)
KBM	11,73 ± 0,62	8,6 ± 0,5
DP	10,95 ± 0,72	170,9 ± 5,8
T	11,82 ± 0,77	353,3 ± 6,9
ÜP	9,21 ± 0,65	15,6 ± 0,7
KD	1,73 ± 0,25	4072,3 ± 26,7

Bitki ürününün fenolik bileşiklerinin, farklı patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal madde olarak kullanılabileceği yaygın olarak bilinmektedir [145]–[147]. Pekmez meyveden üretilen bir ürün olduğu için içerisinde fenolik asit, flavanoid ve antisianinler gibi birçok madde içermektedir. Fenolik maddeler hücre membranının geçirgenlik özelliklerini değiştirir ve maddenin içeri difüze olmasına izin vermektedir. Böylece hücre içi enzimler denatüre olmaktadır [148], [149]. Bu çalışmada, sonuçlar açıkça farklı pekmez örneklerinin *E coli* O157: H7 suşuna karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini açıkça göstermiştir.

#### **4.4. Propolis Örneklerinin Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde**

##### **Miktarının Belirlenmesi**

Propolis örneklerine ait toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Fenolik madde miktarı Şekil 4.1'deki gallik asit kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanmış olup propolis örneğinin toplam fenolik madde içeriği  $54,97 \pm 0,78$  mg GAE/g propolis olarak bulunmuştur.

Propolis besinsel değeri yüksek olan ve farmakolojik anlamda önemli olan bir üründür ve birçok ülkede ticarileşmiştir. Literatürde propolisin toplam fenolik içeriğinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Portekiz'in iki farklı bölgesinden elde edilen propolislerle yapılan bir çalışmada, propolise ait toplam fenolik içeriği  $329,00 \pm 0,01$  ve  $151,00 \pm 0,01$  mg GAE/g olarak bulunduğu bildirilmiştir [150]. Kumazava ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, farklı bölgelerden temin edilen 16 propolisin toplam fenolik madde değerleri  $31,2 \pm$

0,7 – 299 ± 0,5 mg GAE/g arasında bulunduğu belirtilmiştir. Propolis polifenol, amino asit, terpenoid, steroid gibi birçok bileşen içermekte ve bu bileşim propolisin elde edildiği bölge, coğrafik koşullar ve bitki örtüsü gibi etmenlerden etkilenmektedir [151]. Bu nedenle propolisin fenolik madde içerikleri de birbirlerinden çok farklı olabilmektedir.

#### 4.5. Fenolik Örneklerinin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Fenolik örneklerinin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla örnekler öncelikle agar ortamında denenmiş ve daha sonra MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. MIC ve MBC değerleri Çizelge 4.4'te belirtilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Bitki ekstraktlarının MIC ve MBC değerleri

BAKTERİ	ÜZÜM EKSTRAKTI		AYVA EKSTRAKTI		NAR EKSTRAKTI	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i> O157:H7	d/4	d/4	d	d	d/4	d/4

Üzüm ve nar ekstraktlarının MIC ve MBC değerleri d/4 olarak bulunurken, ayva ekstraktının MIC ve MBC değeri d olarak bulunmuştur. Bu bulgular sonucunda üzüm ve nar ekstraktının düşük konsantrasyonlarının bile *E. coli* O157:H7 üzerinde etkili olduğu görülmektedir. MBC değerleri üzüm, ayva ve nar ekstraktı için sırasıyla d/4, d ve d/4 olarak bulunmuştur.

Çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktlar kimyasal maddelerin yerine antimikrobiyal ajan olarak kullanmak için uygun materyallerdir. Bu bitkisel ekstraktların patojen bakteriler üzerindeki etkisi literatürde pek çok çalışmada incelenmiştir. Nar kabuğu ekstraktının enterotoksin üreten *S. aureus* suşuna olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, %1 konsantrasyonunda nar kabuğu ekstraktının bakteri üremesinin engellediği bildirilmiştir [152], [153]. Pagliarulo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, nar kabuğu ekstraktının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı olan antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Ekstraktın *E. coli* için MIC ve



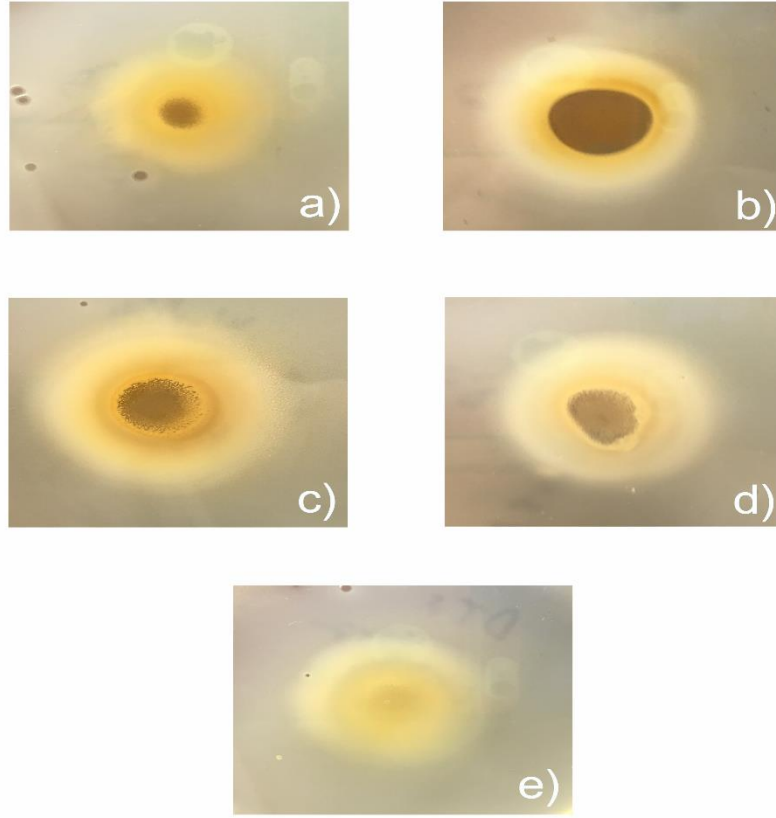
MBC değeri 30 µg/µl ve 70 µg/µl, *S. aureus* için MIC ve MBC değeri 20 µg/µl ve 50 µg/µl olarak bulunduğu bildirilmiştir [154]. Üzüm çekirdeği ekstraktının diş ve diş eti hastalıklarına sebep olan *Porphyromonas gingivalis* ve *Fusobacterium nucleatum* bakterileri üzerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, MIC değeri sırasıyla 4000 ve 2000 µg/µl, MBC değerleri ise 8000 µg/µl olarak bulunduğu bildirilmiştir. Bu tarz ürünlerin besinsel takviye olarak alınabileceği ve patojen bakterilerle mücadelede kullanılabileceği de belirtilmiştir [155].

#### **4.6. Pekmez Örneklerinin Antimikrobia Etkisinin Belirlenmesi**

Pekmez örneklerinin *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla önce agar üzerinde aktivite incelenmiş daha sonra ise sıvı ortamdaki etkinlikleri incelenerek MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir.

Agar ortamında yapılan denemelerde, ağarın üzerine 1:1 oranda seyreltilmiş pekmez örnekleri damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra 150 µL *E. coli* O157:H7 yumuşak agar ile karıştırılarak ağarın üzerine yayılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan inhibisyon zonları gözlenmiştir. T, KD, KBM ve UP örneklerinin oluşturdukları inhibisyon zonları Şekil 4.2'de net bir şekilde görülürken, DP örneğinde zon oluşumu görülmemiştir.

MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Bakteri, besiyeri ve belirlen son konsantrasyonlara sahip olacak şekilde pekmez örnekleri endorfun içerisine eklenmiştir. İnkübasyona bırakılan örneklerden inkübasyon sonunda EMB agara ekim yapılmış ve sonuçlar alınmıştır. Pekmez örneklerinin MIC ve MBC değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Farklı pekmez örneklerinin *E. coli* O57:H7 üzerine etkisi

a) T, b) KD, c) KBM, d) UP, e) DP

Literatürde antimikrobiyal içeriğe sahip maddelerin patojen bakteriler üzerindeki etkisini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Bal ile yapılan bir çalışmada, Portekiz balından izole edilen fenoliklerin *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde ki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. En yüksek antimikrobiyal etkinin *Staphylococcus aureus*'a karşı görüldüğü ve *Staphylococcus lentus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* de inhibe olduğu bildirilmiştir. Fenolik ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir [145]. Takara ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada şeker kamışı melasının *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [156].

**Çizelge 4.5.** Pekmez örneklerinin MIC ve MBC değerleri

Pekmez Örnekleri	MIC (%)	MBC (%)
KBM	50	100
DP	25	50
T	25	50
ÜP	50	100
KD	25	50

Agar ortamında görülen antimikrobiyal etkiden sonra sıvı ortamında da antimikrobiyal etki araştırılmış ve MIC ve MBC değerleri bulunmuştur. KBM, T, UP, DP ve KD pekmez örneklerinin MIC değerleri sırasıyla %50, %25, %50, %25 ve %25 olarak bulunmuştur. Şeker pancarı melasının antimikrobiyal aktivitesini araştıran bir çalışmada, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* MIC değerleri sırasıyla 2,5; 5,0; 0,625 ve 1,25 mg/mL olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, MBC değerleri, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *S. typhimurium* için sırasıyla 5,0; 5,0; 1,5 ve 2,5 mg/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir [157]. Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada şeker pancarı fenoliklerinin *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* bakterilerine olan antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve MIC değerleri sırasıyla 2,5; 5,0; 0,625 ve 1,25 mg/mL olarak bulunmuştur [157].

#### **4.7. Propolis Örneklerinin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal etki belirlenirken %95'lik etanol içerisinde çözülmüş olan propolis ekstraktı kullanılmıştır. Belirli oranlarda propolis ve *E. coli* O157:H7 ependorflara eklenmiş ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda EMB agara ekim yapılmış ve tekrar 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar üzerinden sayım yapılarak MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Kontrol olarak ise %95'lik etanol kullanılmıştır. Aynı şekilde bakteri ile deneme yapılmıştır. MIC ve MBC değeri bakteri inhibisyonun gerçekleştiği en düşük konsantrasyonu olan %6,25 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular sonucunda propolisin düşük konsantrasyonlarda bile antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Propolis biyolojik özellikleri nedeniyle sık kullanılan ve araştırılan bir üründür. Propolisin antimikrobiyal özellikleri üzerine literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu bulunan MIC değerleri geniş bir skalada değişim göstermektedir. Alencar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada propolisin hekzan, kloroform ve etanol fraksiyonu kullanılmış ve bu fraksiyonların *S. aureus* ve *S. mutans* üzerine olan etkisi incelenmiştir. Bakterilere karşı en etkili propolisin kloroform fraksiyonu olduğu tespit edilmiş ve MIC değeri 25-50 µg/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir. Etanol fraksiyonunun MIC değeri 50-100 µg/MI olarak bulunurken hekzan fraksiyonunda antimikrobiyal etki gözlenmediği belirtilmiştir [158].

#### **4.8. Doğal Bitki Ekstraktlarının Faj Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi**

Bitki ekstraktlarının faj plak büyüklüklerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Agarın üzerine 50 µl d, d/2 ve d/4 konsantrasyonlarında örnekler damlatılmış ve üzerine bakteri ve faj içeren yumuşak agar karışımını dökülmüştür. Bir gece inkübasyon sonunda faj plakları incelenmiştir.

Ayva, üzüm ve nar ekstraktlarının *E. coli* O157:H7 bakterisine ait altı farklı fajının (tp1, tp2, tp3, tp4, tp5, tp6) plak büyüklükleri üzerine olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Ayva ekstraktının d konsantrasyonu tp1, tp3, tp5 ve tp6 fajlarına karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. d/2 ve d/4 konsantrasyonlarında ise plak büyüklüklerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ayva ekstraktının tüm konsantrasyonları tp4 fajının plak büyüklüğünün etkilemediği gözlenmiştir. Üzüm ekstraktında ise d ve d/2 konsantrasyonu tp1, tp3, tp4 ve tp6 için inhibisyon etkisi gösterirken, tp5 için yalnızca d konsantrasyonu inhibisyon etkisi göstermiş ve d/2 konsantrasyonu plak büyüklüğünde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Tüm fajlar için d/4 konsantrasyonu plak boyutuna etki etmemiştir. Nar ekstraktının d, d/2 ve d/4 konsantrasyonları tüm fajlar için inhibisyon etkisi göstermiştir.

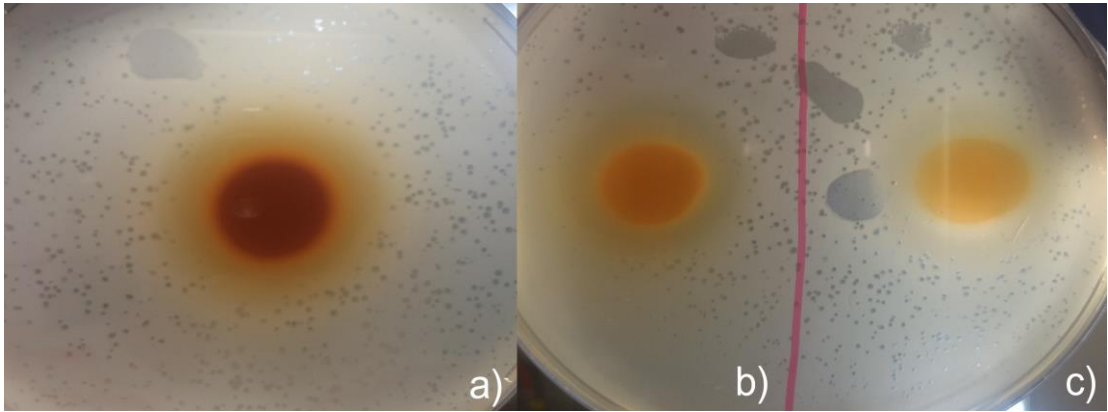
**Çizelge 4.6.** Bitki ekstraktlarının faj plak büyüklüklerine olan etkisi

FAJLAR	AYVA EKSTRAKTI			ÜZÜM EKSTRAKTI			NAR EKSTRAKTI		
	d	d/2	d/4	d	d/2	d/4	d	d/2	d/4
tp1	-	↔	↔	-	-	↔	-	-	-
tp2	-	↔	↔	-	↔	↔	-	-	-
tp3	-	↔	↔	-	-	↔	-	-	-
tp4	↔	↔	↔	-	-	↔	-	-	-
tp5	-	-	-	-	↔	↔	-	-	-
tp6	-	-	-	-	-	↔	-	-	-

'-': Plak inhibisyonu gözlenmiş.

'↔': Plak boyutunda değişiklik gözlenmemiş.

Şekil 4.3'te nar ekstraktının tp5 fajının plaklarına olan etkisi gösterilmiştir. Nar ekstraktının d, d/2 ve d/4 konsantrasyonları tp5 fajının plak oluşumunu engellediği görülmüştür.



**Şekil 4.3.** Nar ekstraktının tp5 fajının plaklarına olan etkisi

a) d konsantrasyonu; b) d/2 konsantrasyonu; c) d/4 konsantrasyonu

Fajlar birçok alanda patojen bakteriler ile mücadelede kullanılmaktadır. Fakat bakterilerin kullanıldığı proseslerde fajlar önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin süt ve süt ürünleri endüstrisinde starter bakteriler kullanılmakta olup bu bakterilere ait fajların ortamda bulunması kültürün çalışmasını engellemekte ve proste soruna neden olmaktadır. Fenolik maddelerin fajlar üzerindeki antiviral etkisi fenolik bileşiklerin bu tür proseslerde koruma ajanı olarak kullanılabileceği göstermektedir.

#### 4.9. Propolis Örneğinin Fajlara ve Faj Plak Büyüklüğüne Olan Etkisi

Propolis örneğinin fajlara olan etkisi anlaşılması amacıyla bakteri, faj ve propolis yumuşak agar yardımıyla agar petri üzerine yayılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla aynı deneme %95'lik etanol kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca yalnızca faj yayılarak da kontrol örneği hazırlanmıştır. Etki hem faj plakları hem de faj sayıları izlenerek incelenmiştir. Propolisin faj plaklarına olan etkisi Çizelge 4.7'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Propolis örneklerinin fajlara olan etkisi

	FAJLAR					
	tp1	tp2	tp3	tp4	tp5	tp6
Faj titresi (Kontrol)	9,60	8,30	9,08	8,20	9,00	9,48
Propolis						
d/4	-	-	-	-	-	-
d/8	6,60	-	-	6,78	-	-
d/16	6,95	-	8,10	6,92	8,24	8,34
d/32	8,68	7,00	8,33	7,26	8,46	8,62
Kontrol						
d/4	-	7,64	8,00	6,08	7,90	8,12
d/8	6,95	8,78	7,89	6,70	8,00	8,38

d/16	8,38	7,70	8,21	7,35	8,32	8,67
d/32	8,70	7,78	8,67	7,58	8,80	8,90

\*Faj titreleri log pfu/mL olarak verilmiştir.

Propolis örneğinin, kontrolün ve yalnızca fajın faj plak büyüklükleri incelenmiş ve aralarında belirgin bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir. Fakat faj titreleri incelendiğinde ise propolis örneğinin faj titresinin azalttığı görülmüştür. Propolis örneğinin d/4 ve d/8 konsantrasyonlarında tp3 fajının plağı görülmezken alkol kullanılarak yapılan kontrol denemesinde 8,00 ve 7,89 log kob/mL olarak bulunmuştur. Bu nedenle bu konsantrasyonlarda görülen etkinin propolisten kaynaklandığı düşünülmektedir. Propolisin d/16 ve d/32 konsantrasyonlarında ciddi bir düşüş yaşanmamıştır. Propolisin d/16 konsantrasyonunda ise yalnızca faj içeren kontrol örneğine göre 0,98 log'luk bir düşüş görülürken d/32 konsantrasyonunda 0,75 log'luk bir düşüş yaşanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda propolisin faj üzerinde antiviral bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

#### **4.10. Faj ile Pekmez Örnekleri Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi**

##### **4.10.1. Pekmez Örneklerinin Faj Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi**

Faj ve pekmez numuneleri arasındaki etkileşimi belirlemek için çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Pekmez örnekleri agar ortam üzerine 50 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Yumuşak agar içerisine eklenen bakteri ve faj karışımı agar üzerine yayılmıştır. Denemeler d/2, d/4, d/8 ve d/16 olmak üzere dört farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 5 farklı pekmez örneği ve altı farklı *E. coli* O157:H7 fajı için yapılmış olup sonuçlar Çizelge 4.8.'te verilmiştir.

Çizelgede görüldüğü üzere farklı fajların pekmez örnekleri varlığındaki plak gelişimleri farklıdır. KBM, DP ve T pekmezlerinin d/2, d/4 ve d/8 konsantrasyonlarında tp1 fajının plak büyüklüğü artmıştır. KD örneğinde ise sadece d/2 ve d/4 konsantrasyonları plak büyüklüğünde artışa neden olurken ÜP örneğinin tüm konsantrasyonlarında plak büyüklüğünde artış görülmüştür.

**Çizelge 4.8.** Pekmez örneklerinin *E. coli* O157:H7 fajlarının plak büyüklüklerine olan etkisi

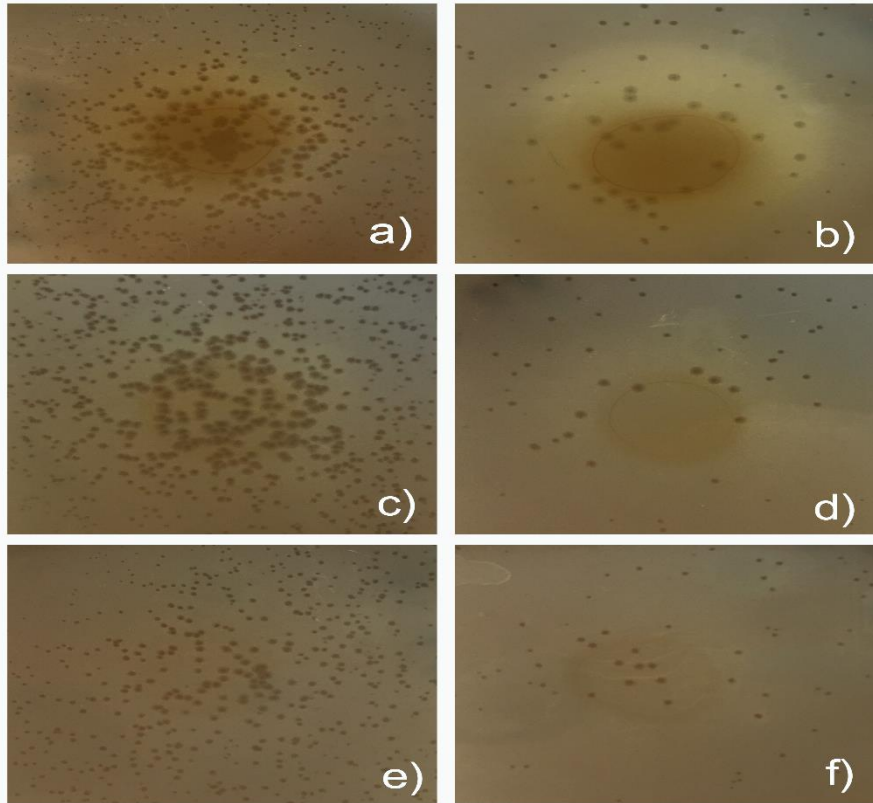
<b>FAJLAR</b>							
<b>PEKMEZ ÖRNEKLERİ</b>	<b>tp1</b>	<b>tp2</b>	<b>tp3</b>	<b>tp3</b>	<b>tp4</b>	<b>tp5</b>	<b>tp6</b>
<b>KBM</b>							
<b>d/2</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/4</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/8</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/16</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>DP</b>							
<b>d/2</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/4</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/8</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/16</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>KD</b>							
<b>d/2</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/4</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/8</b>	-	-	↑	↑	-	-	-
<b>d/16</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ÜP</b>							
<b>d/2</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/4</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/8</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<b>d/16</b>	↑	↑	-	-	↑	-	-



T							
d/2	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
d/4	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
d/8	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑
d/16	-	-	-	-	↑	-	-

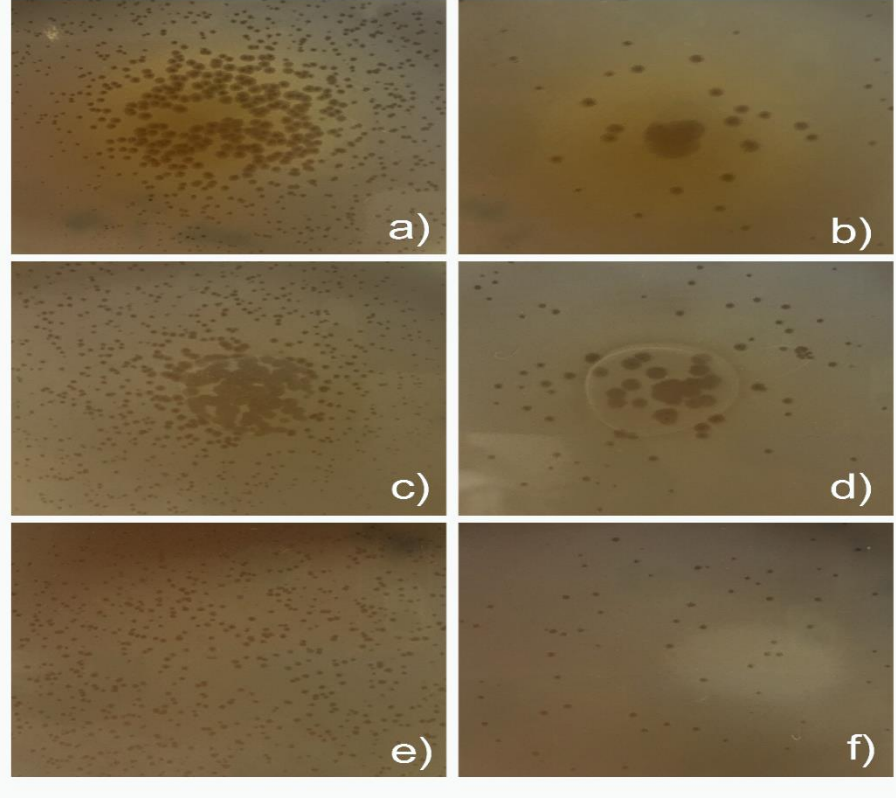
*E. coli* tp4 fajında ise T ve ÜP örneklerinin tüm konsantrasyonlarında plak boyutu artmıştır. KBM ve DP örneklerinde ise d/16 konsantrasyonunda plak boyutunda değişim olmazken, diğer konsantrasyonlarda plak boyutu artmıştır.

Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de tüm pekmez örneklerinin tp3 fajının plak boyutuna olan etkisi gösterilmiştir. Şekil 4.4'te görülebileceği gibi KBM örneğinin d/2 ve d/4 konsantrasyonları faj plak boyutunu arttırırken d/8 konsantrasyonu herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır.



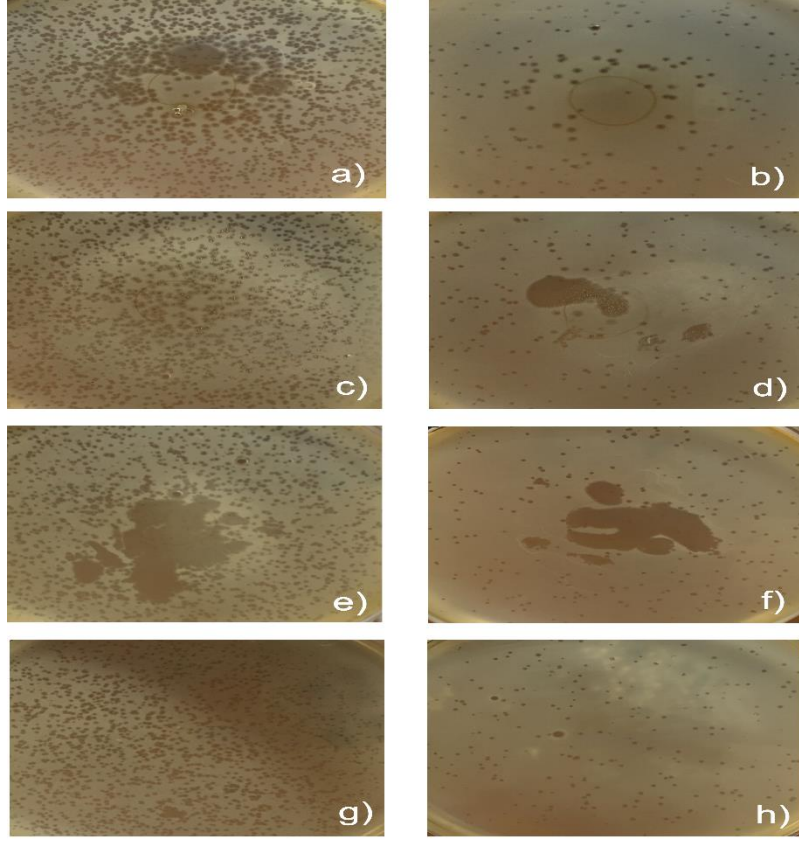
**Şekil 4.4.** KBM pekmez örneğinin *E. coli* O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi

a)  $d/2, 10^{-5}$ ; b)  $d/2, 10^{-6}$ ; c)  $d/4, 10^{-5}$ ; d)  $d/4, 10^{-6}$ ; e)  $d/8, 10^{-5}$ ; f)  $d/8, 10^{-6}$



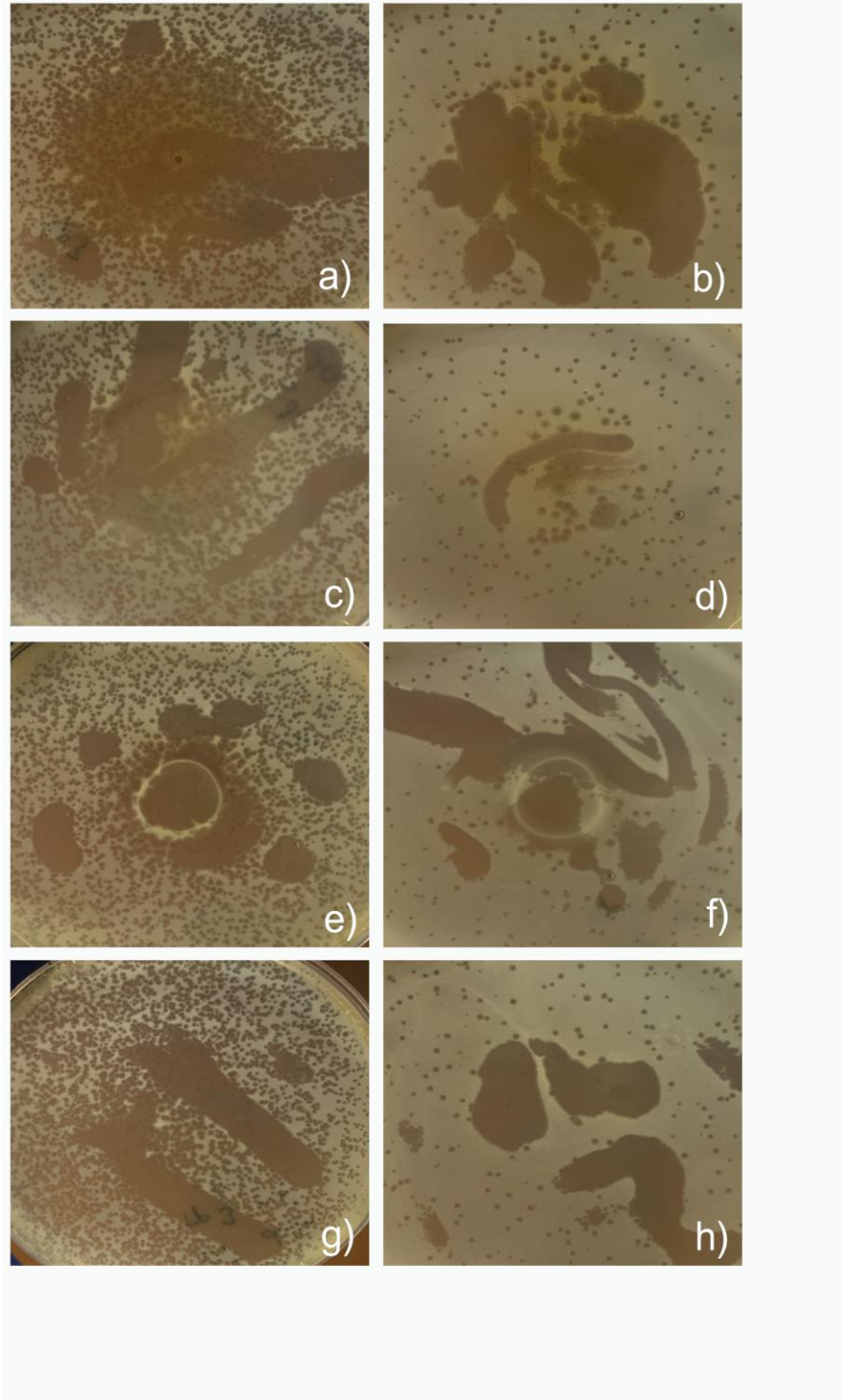
**Şekil 4.5.** T pekmez örneğinin *E. coli* O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi

a)  $d/2, 10^{-5}$ ; b)  $d/2, 10^{-6}$ ; c)  $d/8, 10^{-5}$ ; d)  $d/8, 10^{-6}$ ; e)  $d/16, 10^{-5}$ ; f)  $d/16, 10^{-6}$



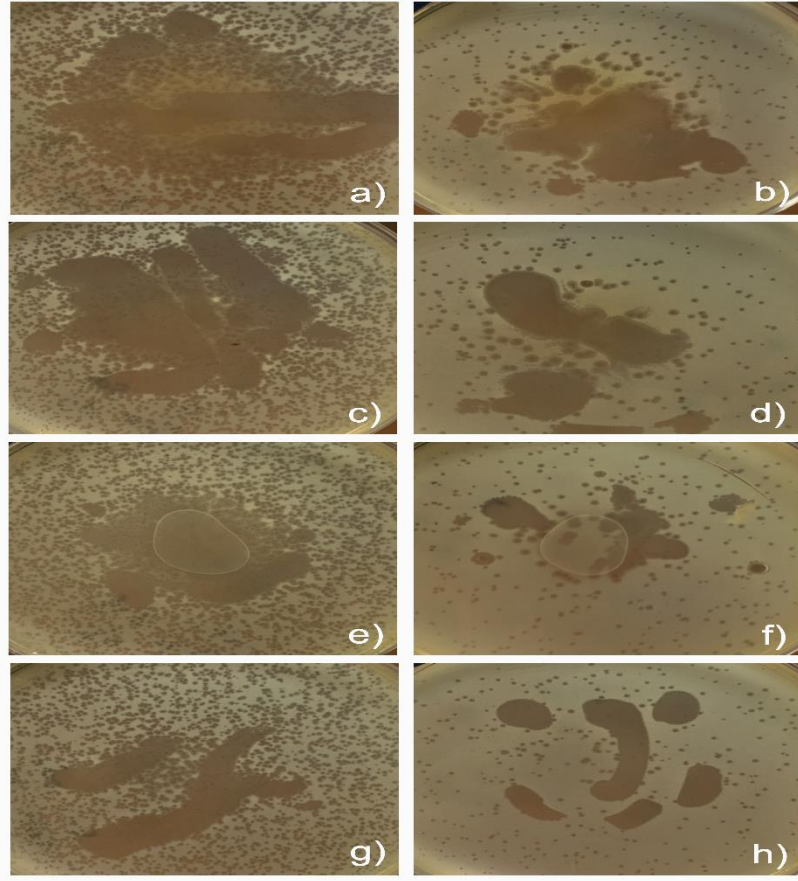
**Şekil 4.6.** KD pekmez örneğinin *E. coli* O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi

a) d/2,  $10^{-5}$ ; b) d/2,  $10^{-6}$ ; c) d/4,  $10^{-5}$ ; d) d/4,  $10^{-6}$ ; e) d/8,  $10^{-5}$ ; f) d/8,  $10^{-6}$ ; g) d/16,  $10^{-5}$ ; h) d/16,  $10^{-6}$



**Şekil 4.7.** DP pekmez örneğinin *E. coli* O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi

a) d/2,  $10^{-5}$ ; b) d/2,  $10^{-6}$ ; c) d/4,  $10^{-5}$ ; d) d/4,  $10^{-6}$ ; e) d/8,  $10^{-5}$ ; f) d/8,  $10^{-6}$ ; g) d/16,  $10^{-5}$ ; h) d/16,  $10^{-6}$



**Şekil 4.8.** ÜP pekmez örneğinin *E. coli* O157:H7 tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi

a) d/2,  $10^{-5}$ ; b) d/2,  $10^{-6}$ ; c) d/4,  $10^{-5}$ ; d) d/4,  $10^{-6}$ ; e) d/8,  $10^{-5}$ ; f) d/8,  $10^{-6}$ ; g) d/16,  $10^{-5}$ ; h) d/16,  $10^{-6}$

Literatürde fenolik içeren maddelerle fajlar arasındaki etkileşimi inceleyen çok az makale bulunmaktadır. Lee tarafından yapılan bir çalışmada kateşin, kafeik asit, gallik asit, kırmızı, beyaz şarap ve şampanya tanninleri, etil alkol ve sodyum metabisülfid'in faj plak oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Plak oluşumunu en çok etkileyen maddelerin ise kateşin, kafeik asit ve gallik asit olduğu ayrıca ticari olarak elde edilen oenosyaninin herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir [159]. Morita tarafından yapılan bir başka çalışmada ise fajların fenolikler ile inaktivasyonu için fenolik varlığında fajların plak oluşumu incelenmiştir. Aynı çalışmada o- ve p-difenollerin fajları önemli derecede inaktive ettiği bildirilmiştir [160].

Pekmez örneklerinin faj plak büyüklüğüne olan etkisi belirlendikten sonra sıvı yalnızca T pekmezinin ve tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi kumpas yardımıyla ölçülmüş ve değerler sayısal olarak verilmiştir. Her bir deneme için pekmez örneklerinin bulunduğu ve bulunmadığı bölgelerde 10 adet plak çapı ölçümü alınmış ve bunların ortalamaları alınarak değerler verilmiştir. Çizelge 4.9.'de görüldüğü üzere tüm pekmez örnekleri faj plaklarının büyümesine neden olmuştur. ÜP örneğinin düşük konsantrasyon değerinde (d/8) bile faj plak büyüklüğü en yüksek değerine ulaşmıştır. KBM ve KD örneklerinde pekmez konsantrasyonu azaldıkça plak çapında azalma olmuştur. T, KBM ve KD örneklerinde en büyük plak çapı d/2 konsantrasyonunda elde edilirken DP örneğinde d/4 konsantrasyonunda, ÜP örneğinde ise d/8 konsantrasyonunda en büyük plak çapı elde edilmiştir. Tüm örnekler için d/16 konsantrasyonunda plak büyüklüğünde önemli bir değişiklik olmamıştır.

**Çizelge 4.9.** Farklı konsantrasyonlardaki pekmez örneklerinin tp3 fajının plak büyüklüğüne olan etkisi

Pekmez örnekleri	PLAK BÜYÜKLÜĞÜ (mm)			
	d/2	d/4	d/8	d/16
T	1.59 ± 0.25	1.34 ± 0.22	1.51 ± 0.14	0.51 ± 0.14
KBM	1.61 ± 0.28	1.27 ± 0.22	1.06 ± 0.13	N/A
KD	1.57 ± 0.21	1.12 ± 0.23	0.93 ± 0.17	0.65 ± 0.35
DP	1.52 ± 0.19	1.62 ± 0.13	1.09 ± 0.20	0.97 ± 0.19
ÜP	1.68 ± 0.26	1.57 ± 0.16	1.69 ± 0.21	0.97 ± 0.24

Pekmez örneği bulunmayan bölgelerde faj büyüklüğü: 0.57 ± 0.22 mm

N/A: Belirgin sonuç saptanamadı.

Literatürde birçok çalışmada çeşitli antimikrobiyal maddelerin fajlarla olan ilişkisinin ortaya konması için faj plak büyüklükleri incelenmiştir. Kamal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 1/4×MIC, 1/2×MIC, 1×MIC, 2×MIC, 4×MIC değerlerindeki ciprofloxacın, meropenem ve tetracycline ile *Burkholderia cepacia*

bakterisine ait KS12 ve KS14 fajlarının birlikte kullanılması ile faj plaklarında artış gözlemlendiği bildirilmiştir [79]. Ryan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bakteriyel biyofilmin kontrol altına alınabilmesi için T4 *E. coli* fajı ile cefotaxime birlikte uygulanmıştır. T4 fajı ile antibiyotiğin birlikte uygulanması, tek başına antibiyotik uygulaması ile kıyaslandığında bakteriyel biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca tek aşamalı gelişme eğrisine bakıldığında antibiyotik varlığının faj patlama büyüklüğünü arttırdığı belirtilmiştir [77].

Fajın patlama büyüklüğü ve hücrenin lize olması için gereken süre plak boyutunu belirleyen önemli özelliklerdendir [131]. Literatürdeki birçok çalışmada faj-antibiyotik arasındaki sinerjistik etki araştırılmıştır. Bu nedenle antibiyotiklerin faj plak büyüklüğü üzerine olan etkisinin araştırılan birçok çalışma literatürde yer almaktadır. Faj plaklarının büyümesinin en önemli nedenlerinden biri antibiyotik varlığında hücre yapısında değişikliklerin meydana gelmesi ve bu durumda faj olgunlaşmasını kolaylaştırması şeklindedir [131]. Ayrıca antibiyotik varlığında hücre uzaması ve kümelenmesi meydana gelmektedir. Bu durum faj reseptörlerinin hücreye bağlanmasını kolaylaştırmaktadır [79].

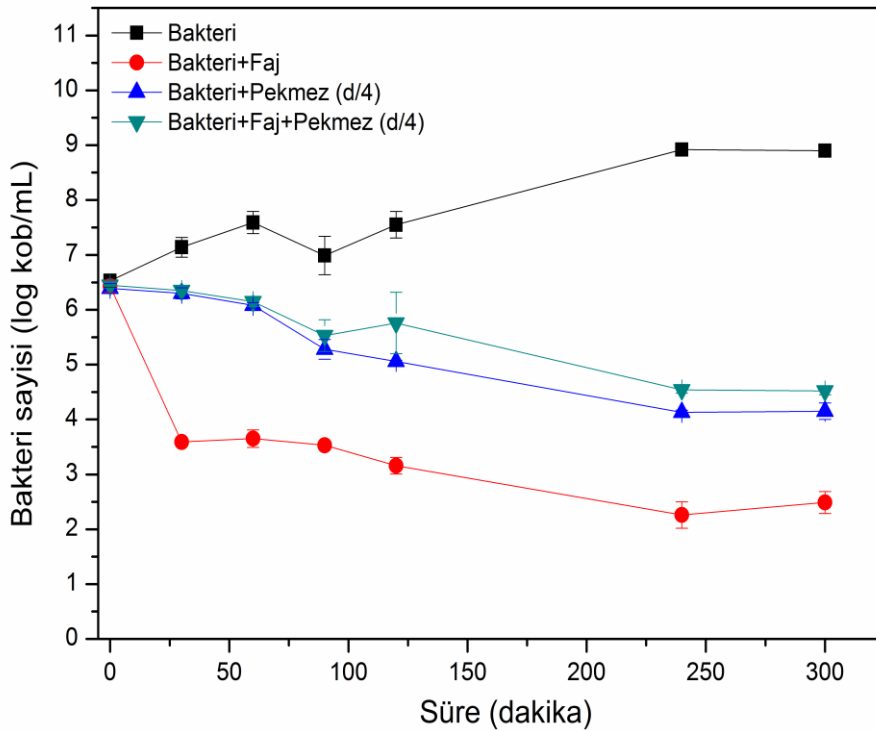
#### **4.10.2. Faj-Pekmez Arasındaki Etkileşimin Sıvı Ortamda İncelenmesi**

Agar ortamında yapılan denemelerde, pekmez örneklerinin damlatıldığı bölgelerde faj plak büyüklüklerinin arttığı gözlemlenmiş ve pekmez ile faj arasında sinerjistik bir etkinin olabileceği düşünülmüştür.

*E. coli* O157:H7 bakterisine ait tp3 fajının ve T pekmez örneğinin arasındaki etkileşimin incelenmesi amacıyla zamana karşı bakteri ve faj gelişimi (Time Kill Curve) incelenmiştir. T pekmez örneği için MIC değeri d/4 (Çizelge 4.5.) olarak bulunmuştu. Zaman-Ölüm Eğrisi deneyleri MIC ve 1/2×MIC değerleri için yapılmıştır. Şekil 4.9.'daki sonuçlara göre, MIC değerinde sadece faj, sadece pekmez ve bunların birleşimi 5 saat sonunda bakteri sayısını sırasıyla 7,24; 2,37 ve 5,90 log azalttığı görülmektedir. MIC değeri için, kontrolle karşılaştırıldığında (8,90 log kob/ mL), 5 saatin sonunda *E. coli* O157: H7'nin bakteriyel sayısı, sadece faj, sadece pekmez ve bunların kombinasyonu için sırasıyla 6,41; 4,75 ve 4,38 log azalmıştır.

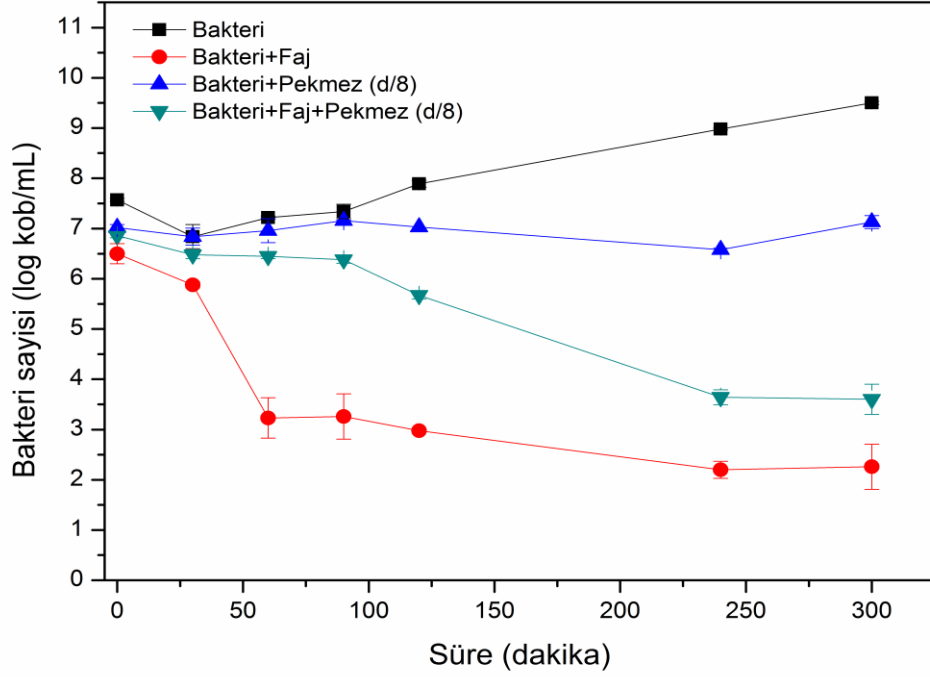


Bu çalışmada sadece faj kullanımının faj ve pekmez kombinasyonunun kullanımından daha etkili olduğu bulunmuştur. Şekil 4.9.'da, MIC değeri için sadece faj kullanımının bakteriyel sayımı 6,41 log'a düşürdüğü ve faj ve melas kullanımının bakteriyel sayı 4,38 logu azalttığı görülmüştür. 1/2×MIC değeri için, yalnızca faj kullanımı, 7,24 log düşüğe neden olurken faj ve melas kombinasyonu bakteri sayısını 5,90 log düşüğe neden olmuştur. Bu, pekmezin fajlara karşı antiviral etkisinden dolayı olabilir. Pekmez numuneleri yüksek miktarda HMF ve fajlara karşı antiviral aktivite gösterebilen fenolik bileşikler içerir. Literatürdeki bazı çalışmalar, fenolik bileşiklerin antiviral bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [161]–[163].



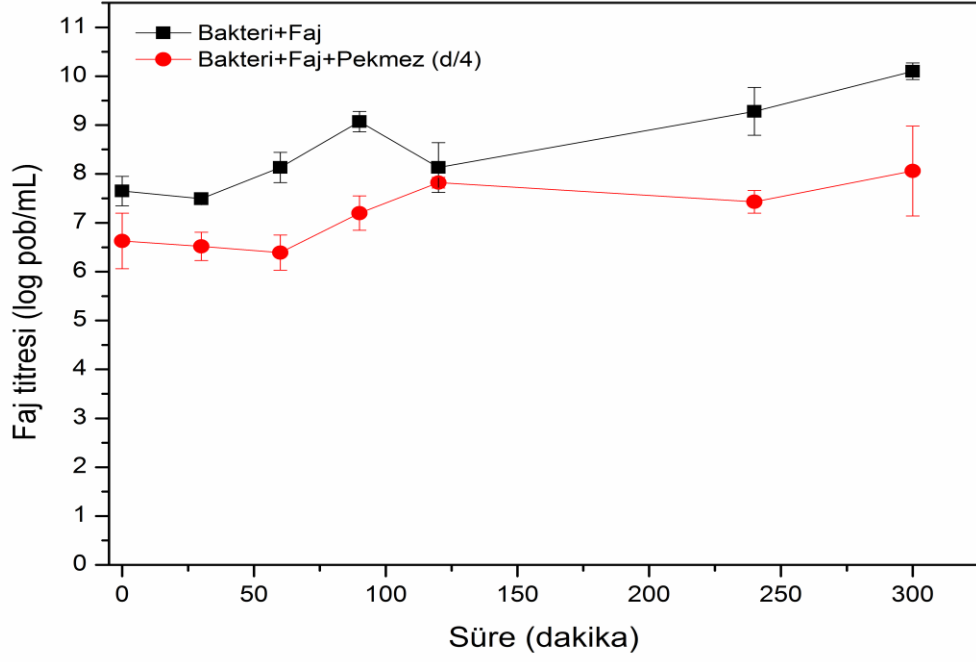
**Şekil 4.9.** d/4 konsantrasyonunda pekmez varlığında zaman-ölüm eğrisi



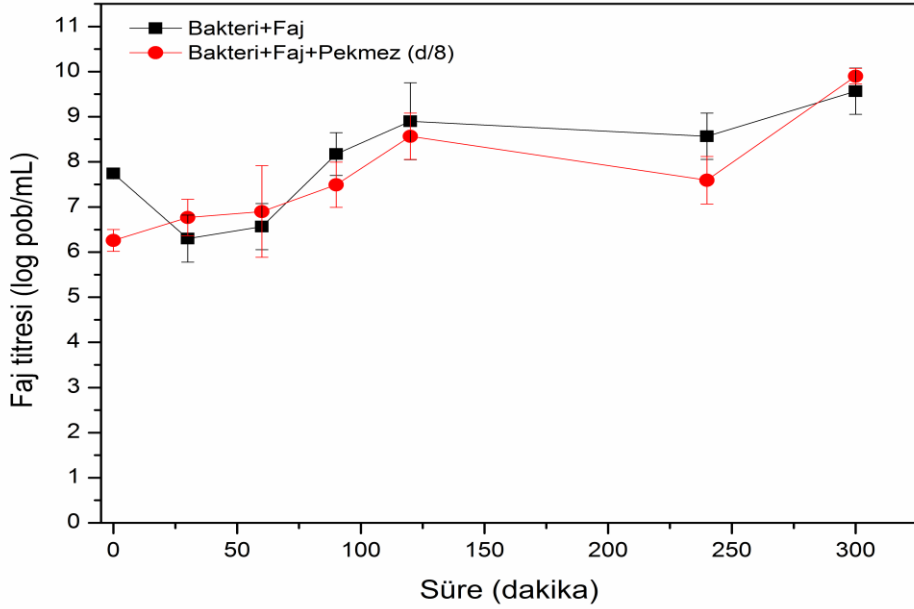


**Şekil 4.10.** d/8 konsantrasyonunda pekmez varlığında zaman-ölüm eğrisi

Ayrıca Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'daki verilerde görülebileceği gibi  $1/2 \times \text{MIC}$  değerindeki faj-pekmez kombinasyonu MIC değerindeki faj-pekmez kombinasyonundan daha etkili olmuştur. MIC değerinde faj-pekmez kombinasyonu 4,38 log düşüğe neden olurken  $1/2 \times \text{MIC}$  değerinde 5,90 log'luk bir düşüş görülmüştür. Bunun nedeni pekmez konsantrasyonunun azlığına bağlı olarak fajın daha iyi aktivite göstermesi olabilir.



Şekil 4.11. d/4 konsantrasyonunda pekmez varlığında faj titresinin değişimi

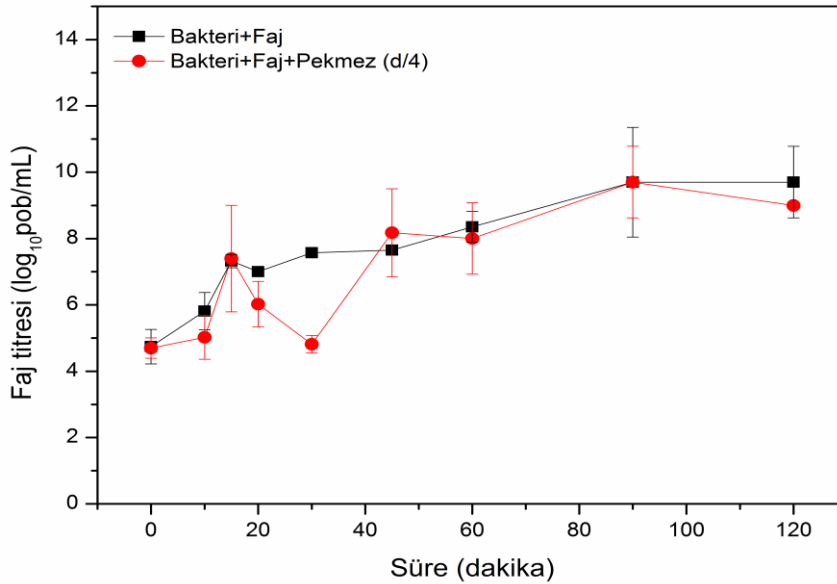


Şekil 4.12. d/8 konsantrasyonunda pekmez varlığında faj titresindeki değişim

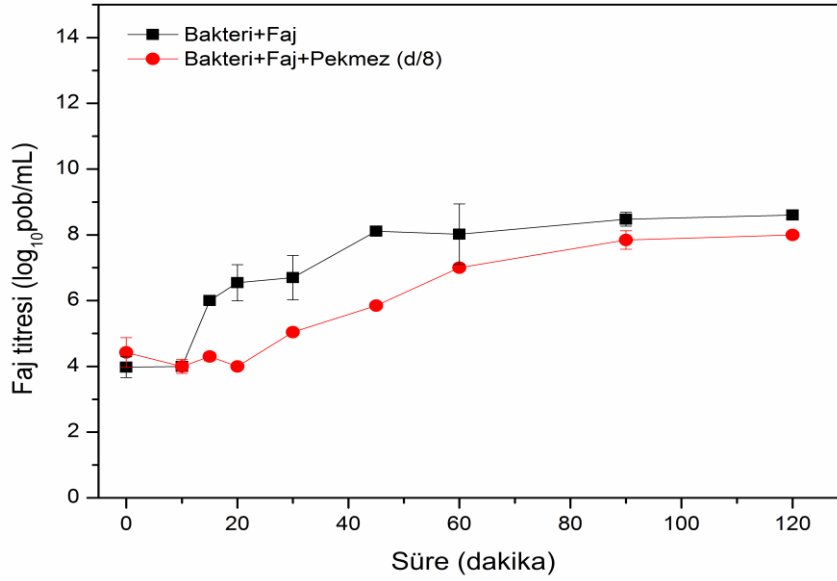
Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de pekmez bulunan ve bulunmayan ortamlardaki faj titreleri gösterilmiştir. Pekmez örneğinin d/4 konsantrasyonu 300 dakika sonunda faj titresinde 2,04 log’luk düşüğe neden olmuştur. Pekmez örneğinin d/8 konsantrasyonu ise 300 dakika sonunda faj titresinde 0,33 log’luk artış görülmüştür.

#### 4.10.3. Tek aşamalı Gelişme Eğrisinin Çıkarılması

*E. coli* O157:H7 bakterisine ait tp3 fajının litik döngüsü parametrelerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve pekmez örneklerinin faj litik döngüsüne olan etkisinin araştırılması amacıyla tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmış ve Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’te gösterilmiştir. Tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılırken MOI değeri 0,1 olarak ayarlanmıştır. Agar ortamında yapılan denemelerde pekmez varlığının faj plakların arttırdığı görülmüştür. Plak artışındaki sebeplerden birisi pekmezin fajın patlama büyüklüğünü arttırmış olması olabilir. Bu nedenle yalnızca faj varlığında ve pekmez ile fajın beraber bulunması durumunda faj gelişim eğrileri çıkarılmıştır.



**Şekil 4.13.** Pekmez bulunan ve bulunmayan ortamda *E. coli* O157:H7 tp3 fajının gelişme eğrisindeki değişim



**Şekil 4.14.** Pekmez bulunan ve bulunmayan ortamda *E. coli* O157:H7 tp3 fajının gelişme eğrisindeki değişim

Faj gelişim eğrisinde faj plaklarının sayısı belirli bir süre boyunca sabit kalırken daha sonra keskin bir şekilde artmaktadır. Lizis öncesi ve sonrası plak sayıları arasındaki oran patlama büyüklüğü olarak ifade edilmektedir. Patlama büyüklüğü ve latent dönem faja ait karakteristik özelliklerden olup kullanılan konakçı, sıcaklık gibi ortam koşullarından etkilenmektedir. Yapılan gelişme eğrisi deneyinde faj ve pekmez yalnızca fajın bakteriye adsorbe olduğu aşamada birbirleri ile etkileştirilmiştir. Daha sonra pekmez ortamdan uzaklaştırılmış ve gelişme eğrisi çıkarılmıştır. Gelişme eğrisi sonuçlarına göre faj tek başına bulunduğu patlama büyüklüğü 183 faj/hücre iken adsorbsiyon aşamasında pekmez (d/8) ile inkübe edildiğinde patlama büyüklüğü 581 faj/hücre olarak belirlenmiştir. Pekmezin d/8 konsantrasyonunda patlama büyüklüğü artmasına rağmen latent dönemin uzadığı, yalnızca faj varlığında 30 dakika, pekmez varlığında ise 45 dakika olduğu belirlenmiştir. Pekmez konsantrasyonu d/4 olarak ayarlanıp adsorbsiyon aşaması gerçekleştirildiğinde ise yalnızca fajın patlama büyüklüğü 180 faj/hücre iken pekmez (d/4) varlığında 299 faj/hücre olarak belirlenmiştir. Latent dönem ise yalnızca faj varlığında 45 dakika olarak bulunurken pekmez (d/4) varlığında 30 dakika olarak bulunmuştur. İki deney farklı günlerde yapıldığı için yalnızca fajın

patlama büyüklüğü iki deneyde farklı çıkmıştır. Ancak farklı ortam koşullarında bu değerlerin farklı çıkabileceği bilinmektedir [164].

#### 4.10.4. Faj Duyarlılığı

Pekmez varlığında faj titresinin nasıl değiştiğini gözlemlemek amacıyla faj duyarlılığı deneyi yapılmıştır. Bakteri ve faj MOI 0,01 olacak şekilde karıştırılmış ve 10 dakika tutunma için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra üzerine son konsantrasyonları d/2, d/4 ve d/8 olacak şekilde T pekmezi eklenmiş ve 37°C'de inkübe edilmiş. İnkübasyonun sonunda çift tabaka agar yöntemi ile faj titreleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** T pekmez örneğinin tp3 fajına olan etkisi

PEKMEZ KONSANTRASYONLARI				
FAJ	KONTROL	d/2	d/4	d/8
tp3	10,18 ± 0,39	3,60 ± 0,58	5,75 ± 0,53	9,87 ± 0,40

\*Faj titrelerinin sonuçları log pfu/mL olarak verilmiştir.

Çizelge 4.10'da görüldüğü üzere d/2 konsantrasyonu faj titresinde 6,58 log'luk bir düşüşe neden olmuştur. d/4 ve d/8 konsantrasyonlarındaki düşüşler ise sırasıyla 4,43 ve 0,31 log şeklindedir. Elde edilen verilere göre pekmez konsantrasyonu arttıkça faj titresinin azaldığı görülmektedir. d/8 konsantrasyonunda faj titresinde çok az bir düşüş görülmüştür.

## 5. SONUÇ VE YORUM

Tez çalışması kapsamında faj terapi uygulaması ile doğal antimikrobiyal içeriğe sahip maddelerin arasındaki etkileşim incelenmiş ve birlikte kullanımları incelenmiştir.

Bu amaçla öncelikle Eliava Enstitüsünden alınan faj karışımından *E. coli* O157:H7 bakterisine ait altı adet faj izole edilmiştir. İzole edilen fajlar plak morfolojilerine göre ayrılmış ve saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma aşamasından sonra zenginleştirme işlemi yapılarak faj titreleri yükseltilmiş ve deneylere yüksek titredeki fajlarla devam edilmiştir.

Tez kapsamında üzüm, ayva, nar ekstraktları, propolis ve pekmez çeşitleri kullanılarak *E. coli* O157:H7 üzerindeki antibakteriyal etki ve fajlarla aralarındaki etkileşim incelenmiştir. Üzüm, ayva, nar ve propolis örneklerinden fenolik madde ekstraksiyonu yapılmış da sonrada da toplam fenolik madde miktarı belirlenerek bu örneklerin karakterizasyonu yapılmıştır. Pekmez örneğinde ise hem toplam fenolik madde miktarı hem de HMF miktarı belirlenmiştir. Daha sonra da bu örneklerin *E. coli* O157:H7 bakterisine karşı antibakteriyal etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Antibakteriyal etki incelenirken öncelikle agar ortamında denemeler yapılmıştır. Üzüm, ayva, nar ekstraktları ve pekmez örnekleri agar petri üzerine damlatılmış ardından üzerine yumuşak agar içerisinde bakteri yayılmıştır. Agar petri bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun ardından inhibisyon zonlarının olup olmadığı gözlenmiştir. T, KD, ÜP ve KBM örneğinde inhibisyon zonları net bir şekilde görülürken DP örneğinde belirgin bir zon oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.2.). Agar ortamı denemelerinin ardından sıvı ortamda da antimikrobiyal etki incelenmiş, üzüm, ayva, nar ekstraktlarının, pekmez örneklerinin ve propolisin MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Üzüm ve nar ekstraktının MIC ve MBC değerleri d/4 olarak bulunurken ayvanın MIC ve MBC değerleri d olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre ayvanın antibakteriyal etkisinin üzüm ve nardan daha düşük olduğunu görülmektedir. Sıvı ortam denemeleri sonucunda tüm pekmez örneklerinin *E. coli* O157:H7 bakterisine karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde propolis örneğinin de düşük konsantrasyonunun bile *E. coli* O157:H7 bakterisine karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tüm örneklerin antibakteriyal etkilerinin, MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesinin ardından daha önce izole edilen altı farklı *E. coli* O157:H7 bakterisi fajı ile olan etkileşimleri incelenmiştir. Örnek ve faj etkileşimleri öncelikle agar ortamında incelenmiştir. Bu amaçla agar üzerine farklı konsantrasyonlarda üzüm, ayva, nar ve pekmez örneklerinden 50 µl damlatılmış daha sonra üzerine yumuşak agar ile bakteri ve faj karışımı yayılmıştır. İnkübasyonun ardından örneklerin difüzyon zonlarında olan ve difüzyon zonlarının dışında olan faj plakları incelenmiştir. Üzüm, ayva ve nar ekstraktlarının yüksek konsantrasyonları (d) faj gelişimini inhibe ederken düşük konsantrasyonları faj plak büyüklüğüne herhangi bir etkide bulunmamıştır. Buradan bu örneklerin fajlara karşı antiviral etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Pekmez örneklerinin farklı konsantrasyonlarının (d/2, d/4, d/8, d/16) faj plak boyutunu etkileyip etkilemediği tüm fajlar üzerinde denenmiştir. Genel olarak bakıldığında d/2, d/4 ve d/8 konsantrasyonları faj plak boyutunu artırırken d/16 plak boyutu üzerine etki etmediği görülmüştür. Fakat bazı fajlar için istisnalar mevcuttur. Propolis örnekleri ve fajlar arasındaki etkileşim incelendiğinde ise propolisin faj plak boyutuna herhangi bir etkide bulunmadığı gözlenmiştir. Fakat faj titrelerine bakıldığında ise propolis konsantrasyonuna bağlı olarak faj titrelerinde düşüş olduğu bulunmuştur. Propolisin d/4 ve d/8 konsantrasyonları faj gelişimini tamamen inhibe ederken d/16 ve d/32 konsantrasyonları tamamen inhibe etmese de faj titrelerini düşürdüğü belirlenmiştir.

Faj ve çeşitli örneklerin arasındaki etkileşim agar ortamında incelendikten sonra en iyi etkinin pekmez örneklerine ait olduğu diğer örneklerin faj gelişimini ya inhibe ettiği ya da etkilemediği bulunmuştur. Bu nedenle pekmez-faj etkileşiminin sıvı ortamdaki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla tp3 fajı ve T pekmez örneği model olarak seçilmiştir. Öncelikle pekmez bulunan ve bulunmayan ortamda zaman gelişme eğrisi çıkarılmıştır. Antibakteriyal etki deneylerinde T pekmezi için MIC değeri d/4 olarak bulunmuştur. Zaman gelişme eğrisi çıkarılırken MIC ve 1/2×MIC olmak üzere iki farklı pekmez konsantrasyonunda denemeler yapılmıştır. İki farklı pekmez konsantrasyonu için yalnızca bakteri, bakteri+faj, bakteri+pekmez ve bakteri+faj+pekmez etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. 300 dakika içinde farklı sürelerde örnekler alınarak bakteri sayısı ve faj titreleri belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ise her iki pekmez konsantrasyonunda da pekmez varlığında fajın daha az çalıştığı görülmüştür. Fakat d/8 konsantrasyonunda faj d/4 konsantrasyonuna kıyasla daha

iyi çalıştığı görülmüştür. Fajın pekmez varlığındaki davranışının daha iyi belirlenebilmesi için tek aşamalı gelişme eğrisi ve faj duyarlılık testi yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda pekmez varlığının faj patlama büyüklüğünü arttırdığı görülmüştür. Faj duyarlılık testi sonuçlarına göre ise  $d/2$ ,  $d/4$  konsantrasyonlarındaki pekmez örneği faj titresinde düşüşe neden olurken  $d/8$  konsantrasyonu ciddi bir etki yaratmamıştır.



## KAYNAKLAR

- [1] M. Frieri, K. Kumar, and A. Boutin, "Antibiotic resistance," *J. Infect. Public Health*, vol. 10, no. 4, pp. 369–378, 2017.
- [2] V. V Morozova, V. V Vlassov, and N. V Tikunova, "Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans," *Front. Microbiol.*, vol. 9, p. 1696, 2018.
- [3] C. Cooper, S. Koonjan, and A. Nilsson, "Enhancing whole phage therapy and their derived antimicrobial enzymes through complex formulation," *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 2, p. 34, 2018.
- [4] "No Title." [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>.
- [5] M. Addis and D. Sisay, "A review on major food borne bacterial illnesses," *J. Trop. Dis. Public Heal.*, 2015.
- [6] D. Dewey-Mattia *et al.*, "Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2016: annual report," 2018.
- [7] B. Ray and A. Bhunia, *Fundamental food microbiology*. CRC press, 2013.
- [8] O. Erkmen and T. F. Bozoglu, *Food Microbiology, 2 Volume Set: Principles Into Practice*. John Wiley & Sons, 2016.
- [9] C. de W Blackburn and P. J. McClure, *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control*. Elsevier, 2009.
- [10] M. Adams, M. O. Moss, and P. McClure, *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, 2016.
- [11] P. M. Davidson, T. M. Taylor, and S. E. Schmidt, "Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds," in *Food microbiology*, American Society of Microbiology, 2013, pp. 765–801.
- [12] M. J. Cheesman, A. Ilanko, B. Blonk, and I. E. Cock, "Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 11, no. 22, p. 57,

2017.

- [13] H. Yoneyama and R. Katsumata, "Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 70, no. 5, pp. 1060–1075, 2006.
- [14] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria," *Am. J. Med.*, vol. 119, no. 6, pp. S3–S10, 2006.
- [15] M. E. Doyle, "Multidrug-resistant pathogens in the food supply," *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 12, no. 4, pp. 261–279, 2015.
- [16] M. Friedman, "Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 15, pp. 3805–3822, 2015.
- [17] A. M. Ahmed, H. Shimabukuro, and T. Shimamoto, "Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan," *J. Food Sci.*, vol. 74, no. 7, pp. M405–M410, 2009.
- [18] A. M. Ahmed, T. Shimamoto, and T. Shimamoto, "Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 189, pp. 39–44, 2014.
- [19] X. Zhao, J. Yang, B. Zhang, S. Sun, and W. Chang, "Characterization of integrons and resistance genes in *Salmonella* isolates from farm animals in Shandong Province, China," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 1300, 2017.
- [20] E. Jamet, E. Akary, M.-A. Poisson, J.-F. Chamba, X. Bertrand, and P. Serror, "Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses," *Food Microbiol.*, vol. 31, no. 2, pp. 191–198, 2012.
- [21] E. Ş. Yılmaz, Ö. Aslantaş, S. P. Önen, S. Türkyılmaz, and C. Kürekci, "Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey," *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 66, pp. 20–26, 2016.
- [22] E. Guerrero-Ramos *et al.*, "Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain," *Food Microbiol.*, vol. 53, pp. 156–164, 2016.
- [23] A. Kilonzo-Nthenge, E. Rotich, and S. N. Nahashon, "Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef," *Poult. Sci.*, vol. 92, no. 4, pp. 1098–

1107, 2013.

- [24] M. Aslam *et al.*, “Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in Salmonella serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada,” *Food Microbiol.*, vol. 32, no. 1, pp. 110–117, 2012.
- [25] D. S. Arathy, G. Vanpee, G. Belot, V. Mathew, C. DeAllie, and R. Sharma, “Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli isolated from commercial chicken eggs in Grenada, West Indies,” *West Indian Med. J.*, vol. 60, no. 1, pp. 53–56, 2011.
- [26] A. Cook, R. Reid-Smith, R. Irwin, S. A. McEWEN, A. Valdivieso-Garcia, and C. Ribble, “Antimicrobial resistance in Campylobacter, Salmonella, and Escherichia coli isolated from retail turkey meat from southern Ontario, Canada,” *J. Food Prot.*, vol. 72, no. 3, pp. 473–481, 2009.
- [27] I. Jado, R. López, E. García, A. Fenoll, J. Casal, and P. García, “Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 52, no. 6, pp. 967–973, 2003.
- [28] A. Wright, C. H. Hawkins, E. E. Ånggård, and D. R. Harper, “A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy,” *Clin. Otolaryngol.*, vol. 34, no. 4, pp. 349–357, 2009.
- [29] R. Khan *et al.*, “Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin,” *Molecules*, vol. 14, no. 2, pp. 586–597, 2009.
- [30] G. Adwan, B. Abu-Shanab, and K. Adwan, “Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains,” *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 3, no. 4, pp. 266–269, 2010.
- [31] D. Gelman *et al.*, “Combined bacteriophages and antibiotics as an efficient therapy against VRE Enterococcus faecalis in a mouse model,” *Res. Microbiol.*, vol. 169, no. 9, pp. 531–539, 2018.
- [32] P. Letrado, B. Corsini, R. Díez-Martínez, N. Bustamante, J. E. Yuste, and P. García, “Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus,” *Future Microbiol.*, vol. 13, no. 11, pp.

- 1215–1223, 2018.
- [33] E. Kutter and A. Sulakvelidze, *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, 2004.
- [34] N. Chanishvili, “Phage therapy—history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches,” in *Advances in virus research*, vol. 83, Elsevier, 2012, pp. 3–40.
- [35] A. A. Cisek, I. Dąbrowska, K. P. Gregorczyk, and Z. Wyżewski, “Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages,” *Curr. Microbiol.*, pp. 1–7, 2017.
- [36] D. M. Lin, B. Koskella, and H. C. Lin, “Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance,” *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, vol. 8, no. 3, p. 162, 2017.
- [37] E. K. Tayyarcı, “Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Biyokontrolünde Faj Terapi Ve Fitoterapinin Birlikte.” Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
- [38] W. M. Woźnica, J. Bigos, and M. B. Łobocka, “Lysis of bacterial cells in the process of bacteriophage release--canonical and newly discovered mechanisms,” *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, vol. 69, pp. 114–126, 2015.
- [39] M. J. Loessner, “Bacteriophage endolysins—current state of research and applications,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, no. 4, pp. 480–487, 2005.
- [40] R. M. Carlton, “Phage therapy: past history and future prospects,” *Arch. Immunol. Ther. Exp. Ed.*, vol. 47, pp. 267–274, 1999.
- [41] H. W. Ackermann, “Bacteriophage taxonomy,” *Microbiol. Aust.*, vol. 32, no. 2, pp. 90–94, 2011.
- [42] G. Novik, A. Ladutska, and D. Rakhuba, “Bacteriophage taxonomy and classification,” *Antimicrob. Res. Nov. Bioknowledge Educ. Programs; Microbiol. B. Ser.*, no. 6, pp. 251–259.
- [43] F. M. Burnet, “The Classification of Dysentery-Coli Bacteriophages. III. A Correlation of the Serological Classification with Certain Biochemical Tests.,” *J. Pathol. Bacteriol.*, vol. 37, pp. 179–184, 1933.
- [44] H.-W. Ackermann, “Bacteriophage observations and evolution,” *Res. Microbiol.*, vol. 154, no. 4, pp. 245–251, 2003.

- [45] D. E. Bradley, "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins.," *Bacteriol. Rev.*, vol. 31, no. 4, p. 230, 1967.
- [46] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, and J. G. Morris, "Bacteriophage therapy," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 3, pp. 649–659, 2001.
- [47] J. N. Housby and N. H. Mann, "Phage therapy," *Drug Discov. Today*, vol. 14, no. 11–12, pp. 536–540, 2009.
- [48] A. Górski, J. Borysowski, R. Miedzybrodzki, and B. Weber-Dabrowska, *Bacteriophages in medicine*. Caister Academic Press Norfolk, 2007.
- [49] W. C. Summers, "Bacteriophage therapy," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 437–451, 2001.
- [50] S. T. Abedon, S. J. Kuhl, B. G. Blasdel, and E. M. Kutter, "Phage treatment of human infections," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 66–85, 2011.
- [51] S. J. Labrie, J. E. Samson, and S. Moineau, "Bacteriophage resistance mechanisms," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, p. 317, 2010.
- [52] F. Oechslin, "Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy," *Viruses*, vol. 10, no. 7, p. 351, 2018.
- [53] S. M. Sillankorva, H. Oliveira, and J. Azeredo, "Bacteriophages and their role in food safety," *Int. J. Microbiol.*, vol. 2012, 2012.
- [54] J. R. Rocourt, G. G. Moy, K. Vierk, J. Schlundt, and W. H. Organization, "The present state of foodborne disease in OECD countries," 2003.
- [55] J. Woolston and A. Sulakvelidze, "Bacteriophages and food safety," *eLS*, pp. 1–13, 2001.
- [56] P. Garcia, B. Martinez, J. M. Obeso, and A. Rodriguez, "Bacteriophages and their application in food safety," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 47, no. 6, pp. 479–485, 2008.
- [57] R. O'Connor, "How foster farms is solving the case of the mystery Salmonella," *Salt. Washington, DC NPR News*, 2014.
- [58] S. Hagens and M. J. Loessner, "Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 76, no. 3, pp. 513–519, 2007.
- [59] S. J. Bach, T. A. McAllister, D. M. Veira, V. P. J. Gannon, and R. A. Holley, "Effect of bacteriophage DC22 on Escherichia coli O157: H7 in an artificial rumen system

- (Rusitec) and inoculated sheep,” *Anim. Res.*, vol. 52, no. 2, pp. 89–101, 2003.
- [60] R. R. Raya *et al.*, “Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in sheep,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 9, pp. 6405–6410, 2006.
- [61] G. J. G. Arachchi *et al.*, “Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 10, pp. 1105–1116, 2013.
- [62] J. Woolston *et al.*, “Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces,” *Bacteriophage*, vol. 3, no. 3, p. e25697, 2013.
- [63] D. Tomat, A. Quiberoni, D. Mercanti, and C. Balagué, “Hard surfaces decontamination of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using bacteriophages,” *Food Res. Int.*, vol. 57, pp. 123–129, 2014.
- [64] T. Abuladze, M. Li, M. Y. Menetrez, T. Dean, A. Senecal, and A. Sulakvelidze, “Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 20, pp. 6230–6238, 2008.
- [65] C. Gong and X. Jiang, “Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces,” *Poult. Sci.*, vol. 96, no. 6, pp. 1838–1848, 2017.
- [66] J. E. Kennedy Jr, J. L. Oblinger, and G. Bitton, “Recovery of coliphages from chicken, pork sausage and delicatessen meats,” *J. Food Prot.*, vol. 47, no. 8, pp. 623–626, 1984.
- [67] N. K. El-DougDoug *et al.*, “Control of *Salmonella* Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 293, pp. 60–71, 2019.
- [68] J. Bai, B. Jeon, and S. Ryu, “Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors,” *Food Microbiol.*, vol. 77, pp. 52–60, 2019.
- [69] A. C. Stratakos and I. R. Grant, “Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic *Escherichia coli* on beef,” *Food Microbiol.*, 2018.

- [70] D. Tomat, C. Casabonne, V. Aquili, C. Balagué, and A. Quiberoni, "Evaluation of a novel cocktail of six lytic bacteriophages against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in broth, milk and meat," *Food Microbiol.*, vol. 76, pp. 434–442, 2018.
- [71] C. Huang *et al.*, "Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices," *Food Res. Int.*, vol. 111, pp. 631–641, 2018.
- [72] W. Phongtang, G.-P. Choi, E. Chukeatirote, and J. Ahn, "Bacteriophage control of *Salmonella* Typhimurium in milk," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 28, no. 1, pp. 297–301, 2019.
- [73] D. Xu *et al.*, "Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in Raw Salmon Fillets and Scallop Adductors by Using Bacteriophage SLMP1," *J. Food Prot.*, vol. 81, no. 8, pp. 1304–1312, 2018.
- [74] H. Zhang *et al.*, "Application of a phage in decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in oysters," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 275, pp. 24–31, 2018.
- [75] A. Jo, T. Ding, and J. Ahn, "Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against *Staphylococcus aureus*," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 25, no. 3, pp. 935–940, 2016.
- [76] P. Knezevic, S. Curcin, V. Aleksic, M. Petrusic, and L. Vlaski, "Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*," *Res. Microbiol.*, vol. 164, no. 1, pp. 55–60, 2013.
- [77] E. M. Ryan, M. Y. Alkawareek, R. F. Donnelly, and B. F. Gilmore, "Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 395–398, 2012.
- [78] N. Valério *et al.*, "Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*," *Virus Res.*, vol. 240, pp. 8–17, 2017.
- [79] F. Kamal and J. J. Dennis, "*Burkholderia cepacia* complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 3, pp. 1132–1138, 2015.
- [80] S. Viazis, M. Akhtar, J. Feirtag, and F. Diez-Gonzalez, "Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde," *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 149–157, 2011.

- [81] A. Chibeu, L. Agius, A. Gao, P. M. Sabour, A. M. Kropinski, and S. Balamurugan, "Efficacy of bacteriophage LISTEX™ P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 167, no. 2, pp. 208–214, 2013.
- [82] M. Kutateladze and R. Adamia, "Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 12, pp. 591–595, 2010.
- [83] M. D. Mathur, S. Vidhani, P. L. Mehndiratta, P. Bhalla, and B. S. N. Reddy, "Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics," *JOURNAL-ASSOCIATION OF PHYSICIANS OF INDIA*, vol. 51, pp. 593–596, 2003.
- [84] A. Bruttin and H. Brüssow, "Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 7, pp. 2874–2878, 2005.
- [85] M. de L. R. Giada, "Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power," in *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants*, InTechOpen, 2013.
- [86] A.-M. Boudet, "Evolution and current status of research in phenolic compounds," *Phytochemistry*, vol. 68, no. 22–24, pp. 2722–2735, 2007.
- [87] Ö. Turfan, M. Türkyılmaz, O. Yemiş, and M. Özkan, "Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit," *Food Chem.*, vol. 129, no. 4, pp. 1644–1651, 2011.
- [88] A. Valavanidis and T. Vlachogianni, "Plant polyphenols: recent advances in epidemiological research and other studies on cancer prevention," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 39, Elsevier, 2013, pp. 269–295.
- [89] F. Daayf and V. Lattanzio, "Recent Advances in Polyphenol Research. Volume 1," 2008.
- [90] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, "Flavonoids: an overview," *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, 2016.
- [91] P. V. A. Babu and D. Liu, "Flavonoids and cardiovascular health," in *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, Elsevier, 2009, pp. 371–392.
- [92] K.-T. Chung, T. Y. Wong, C.-I. Wei, Y.-W. Huang, and Y. Lin, "Tannins and human



- health: a review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 38, no. 6, pp. 421–464, 1998.
- [93] M. Goleniowski, M. Bonfill, R. Cusido, and J. Palazón, “Phenolic acids,” *Nat. Prod. Phytochem. Bot. Metab. alkaloids, phenolics terpenes*, pp. 1951–1973, 2013.
- [94] R. J. Robbins, “Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 10, pp. 2866–2887, 2003.
- [95] E. İbrahim, “BİTLİS İLİNDE GELENEKSEL OLARAK ÜRETİLEN GEZO PEKMEZİNİN BAZI KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ.” Bitlis Eren Üniversitesi, 2015.
- [96] M. Sengül, M. F. Ertugay, and M. Sengül, “Rheological, physical and chemical characteristics of mulberry pekmez,” *Food Control*, vol. 16, no. 1, pp. 73–76, 2005.
- [97] H. Yoğurtçu and F. Kamışlı, “Determination of rheological properties of some pekmez samples in Turkey,” *J. Food Eng.*, vol. 77, no. 4, pp. 1064–1068, 2006.
- [98] M. İ. Aksu and S. Nas, “Dut pekmezi üretim tekniği ve çeşitli fiziksel-kimyasal özellikleri,” *Gıda Derg.*, vol. 21, no. 2, 1996.
- [99] M. Alpaslan and M. Hayta, “Rheological and sensory properties of pekmez (grape molasses)/tahin (sesame paste) blends,” *J. Food Eng.*, vol. 54, no. 1, pp. 89–93, 2002.
- [100] S. Kamiloglu and E. Capanoglu, “In vitro gastrointestinal digestion of polyphenols from different molasses (pekmez) and leather (pestil) varieties,” *Int. J. food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 4, pp. 1027–1039, 2014.
- [101] N. Tetik, İ. Turhan, M. Karhan, and H. R. Öziyici, “Characterization of, and 5-Hydroxymethylfurfural concentration in carob pekmez,” *GIDA J. FOOD*, vol. 35, no. 6, pp. 417–422, 2010.
- [102] A. Simsek, “Research on the composition of different fruit concentrate.” Master’s Thesis, Ankara University Graduate School of Natural and Applied ..., 2000.
- [103] E. Karababa and N. Develi Isikli, “Pekmez: A traditional concentrated fruit product,” *Food Rev. Int.*, vol. 21, no. 4, pp. 357–366, 2005.
- [104] I. Akinci, F. Ozdemir, A. Topuz, O. Kabas, and M. Canakci, “Some physical and nutritional properties of *Juniperus drupacea* fruits,” *J. Food Eng.*, vol. 65, no. 3, pp. 325–331, 2004.
- [105] M. Karakaya and N. Artık, “Zile pekmezi üretim tekniği ve bileşim unsurlarının

- belirlenmesi,” *GIDA/THE J. FOOD*, vol. 15, no. 3, 1990.
- [106] A. Simsek and N. Artık, “Studies of composition of concentrates from different fruit,” *Gıda*, vol. 27, no. 6, pp. 459–467, 2002.
- [107] O. Yıldız, H. Şahin, M. Kara, R. Aliyazıcıoğlu, Ö. Tarhan, and S. Kolaylı, “Maillard reaksiyonları ve reaksiyon ürünlerinin gıdalardaki önemi,” *Akad. Gıda*, vol. 8, no. 6, pp. 44–51, 2010.
- [108] R. A. Oral, M. Dogan, K. Sarioglu, and Ö. S. Toker, “5-hydroxymethyl furfural formation and reaction kinetics of different pekmez samples: effect of temperature and storage,” *Int. J. food Eng.*, vol. 8, no. 4, 2012.
- [109] N. Kalogeropoulos, S. J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinos, and V. T. Karathanos, “Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus,” *Food Chem.*, vol. 116, no. 2, pp. 452–461, 2009.
- [110] G. A. Burdock, “Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis),” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 36, no. 4, pp. 347–363, 1998.
- [111] F. A. Santos *et al.*, “Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens,” *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 285–289, 2003.
- [112] M.-R. Ahn *et al.*, “Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China,” *Food Chem.*, vol. 101, no. 4, pp. 1383–1392, 2007.
- [113] V. S. Bankova, S. L. de Castro, and M. C. Marcucci, “Propolis: recent advances in chemistry and plant origin,” *Apidologie*, vol. 31, no. 1, pp. 3–15, 2000.
- [114] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, and S. Popov, “Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 64, no. 3, pp. 235–240, 1999.
- [115] S. I. Anjum *et al.*, “Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review,” *Saudi J. Biol. Sci.*, 2018.
- [116] Y. M. Choi, D. O. Noh, S. Y. Cho, H. J. Suh, K. M. Kim, and J. M. Kim, “Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea,” *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 39, no. 7, pp. 756–761, 2006.
- [117] J. C. Silva, S. Rodrigues, X. Feás, and L. M. Estevinho, “Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis,” *Food Chem. Toxicol.*, vol.

50, no. 5, pp. 1790–1795, 2012.

- [118] A. Yildirim *et al.*, “Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2,” *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, vol. 22, p. 422, 2016.
- [119] K. B. Santiago, B. J. Conti, E. de O. Cardoso, M. de A. Golim, and J. M. Sforcin, “Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes,” *Pathog. Dis.*, vol. 74, no. 8, 2016.
- [120] F. Hu, H. R. Hepburn, Y. Li, M. Chen, S. E. Radloff, and S. Daya, “Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 100, no. 3, pp. 276–283, 2005.
- [121] E. Acar Soykut, “Streptococcus thermophilus ve Lactobacillus bulgaricus virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları,” *Ankara Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı Doktora Tezi*, vol. 176, 2007.
- [122] Y. Menteş, “Ö.,(2011). Türkiye’de Yetiştirilen Başlıca Buğday Çeşitlerinin Antioksidan Aktivitelerinin ve Fenolik Asit Dağılımlarının Belirlenmesi ve Ekmeğin Nar Kabuğu Ekstraktı ile Zenginleştirilmesi.” Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [123] L. Yu, S. Haley, J. Perret, and M. Harris, “Antioxidant properties of hard winter wheat extracts,” *Food Chem.*, vol. 78, no. 4, pp. 457–461, 2002. *forsch. A*, vol. 102, no. 3, pp. 161–167, 1955.
- [125] V. L. Singleton and J. A. Rossi, “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, 1965.
- [126] P. Matic, M. Sabljic, and L. Jakobek, “Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content,” *J. AOAC Int.*, vol. 100, no. 6, pp. 1795–1803, 2017.
- [127] Y.-W. Chen, S.-R. Ye, C. Ting, and Y.-H. Yu, “Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis,” *J. food drug Anal.*, vol. 26, no. 2, pp. 761–768, 2018.
- [128] H. H. Oruç, A. Sorucu, H. H. Ünal, and L. Aydın, “Effects of season and altitude on biological active certain phenolic compounds levels and partial standardization of propolis,” *Ankara Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, vol. 64, no. 1, pp. 13–20, 2017.

- [129] D. A. Samac, A. M. Willert, M. J. McBride, and L. L. Kinkel, "Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa," *Appl. soil Ecol.*, vol. 22, no. 1, pp. 55–66, 2003.
- [130] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, 2016.
- [131] A. M. Comeau, F. Tétart, S. N. Trojet, M.-F. Prere, and H. M. Krisch, "Phage-antibiotic synergy (PAS):  $\beta$ -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth," *PLoS One*, vol. 2, no. 8, p. e799, 2007.
- [132] P. Verma, "Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis," *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. CRC Press, New York, NY, USA, pp. 275–290, 2007.
- [133] G. Clara, G. K. Y. Limsowtin, L. Séchaud, M. Veaux, and J.-P. Accolas, "Evidence for a plasmid-linked restriction-modification system in *Lactobacillus helveticus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 11, pp. 3412–3419, 1990.
- [124] O. Winkler, "Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig," *Zeitschrift für Leb. Und-*
- [134] V. B. Suárez, A. Quiberoni, A. G. Binetti, and J. A. Reinheimer, "Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries," *J. Food Prot.*, vol. 65, no. 10, pp. 1597–1604, 2002.
- [135] W. Elfalleh, H. Hannachi, N. Tlili, Y. Yahia, N. Nasri, and A. Ferchichi, "Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower," *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 32, pp. 4724–4730, 2012.
- [136] A. Bucić-Kojić, M. Planinić, S. Tomas, M. Bilić, and D. Velić, "Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds," *J. Food Eng.*, vol. 81, no. 1, pp. 236–242, 2007.
- [137] T. M. Rababah, N. S. Hettiarachchy, and R. Horax, "Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 16, pp. 5183–5186, 2004.
- [138] O. Yildiz, "Physicochemical and sensory properties of mulberry products:

- Gümüşhane pestil and köme,” *Turkish J. Agric. For.*, vol. 37, no. 6, pp. 762–771, 2013.
- [139] R. Aliyazicioglu *et al.*, “Determination of chemical, physical and biological characteristics of some pekmez (molasses) from Turkey,” *Asian J. Chem.*, vol. 21, no. 3, pp. 2215–2223, 2009.
- [140] Z. Akkaya, J. Schröder, S. Tavman, S. Kumcuoglu, H. P. Schuchmann, and V. Gaukel, “Effects of spray drying on physical properties, total phenolic content and antioxidant activity of carob molasses,” *Int. J. food Eng.*, vol. 8, no. 4, 2012.
- [141] S. Kamiloglu, O. Serali, N. Unal, and E. Capanoglu, “Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (*Morus nigra* L.) products,” *J. Berry Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 41–51, 2013.
- [142] A. R. Selcuk, E. Demiray, and Y. Yilmaz, “Antioxidant Activity of Grape Seeds Obtained from Molasses (Pekmez) and Winery Production.,” *Acad. Food Journal/Akademik GIDA*, 2011.
- [143] C. Alasalvar, M. Al-Farsi, and F. Shahidi, “Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez,” *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 1, pp. S47–S52, 2005.
- [144] N. Gungor and M. Sengul, “Antioxidant activity, total phenolic content and selected physicochemical properties of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 11, no. 1, pp. 44–52, 2008.
- [145] L. Estevinho, A. P. Pereira, L. Moreira, L. G. Dias, and E. Pereira, “Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 12, pp. 3774–3779, 2008.
- [146] A. Pereira *et al.*, “Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves,” *Molecules*, vol. 12, no. 5, pp. 1153–1162, 2007.
- [147] J.-P. Rauha *et al.*, “Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 3–12, 2000.
- [148] S. Moreno, T. Scheyer, C. S. Romano, and A. A. Vojnov, “Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition,” *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 223–231, 2006.

- [149] F. Shahidi and M. Naczki, "Nutritional and pharmacological effects of food phenolics," *En Food phenolics sources, Chem. Eff. Appl. 1a ed. Lancaster, PA Technomic Pub. Co*, pp. 171–191, 1995.
- [150] L. Moreira, L. G. Dias, J. A. Pereira, and L. Estevinho, "Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 11, pp. 3482–3485, 2008.
- [151] S. Kumazawa, T. Hamasaka, and T. Nakayama, "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins," *Food Chem.*, vol. 84, no. 3, pp. 329–339, 2004.
- [152] S. R. Kanatt, R. Chander, and A. Sharma, "Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products," *Int. J. food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 2, pp. 216–222, 2010.
- [153] L. C. Braga *et al.*, "Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 96, no. 1–2, pp. 335–339, 2005.
- [154] C. Pagliarulo *et al.*, "Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Food Chem.*, vol. 190, pp. 824–831, 2016.
- [155] A. Furiga, A. Lonvaud-Funel, and C. Badet, "In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract," *Food Chem.*, vol. 113, no. 4, pp. 1037–1040, 2009.
- [156] K. Takara, K. Ushijima, K. Wada, H. Iwasaki, and M. Yamashita, "Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria," *J. Oleo Sci.*, vol. 56, no. 11, pp. 611–614, 2007.
- [157] M. Chen, Z. Zhao, H. Meng, and S. Yu, "The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens," *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 82, pp. 354–360, 2017.
- [158] S. M. Alencar *et al.*, "Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 113, no. 2, pp. 278–283, 2007.
- [159] A. Lee, R. Eschenbruch, and J. Waller, "Effect of phenolic compounds, ethyl alcohol, and sodium metabisulphite on the lytic activity of phage PL-1 on a *Lactobacillus casei* S strain," *Can. J. Microbiol.*, vol. 31, no. 9, pp. 873–875, 1985.

- [160] J. Morita, "Inactivation of bacteriophages by polyphenols in the presence of cupric ion," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 52, no. 7, pp. 1669–1673, 1988.
- [161] J. H. Chávez *et al.*, "Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus," *Vet. Microbiol.*, vol. 116, no. 1–3, pp. 53–59, 2006.
- [162] J.-H. Lee *et al.*, "Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80, no. 6, pp. 1196–1204, 2016.
- [163] R. Li *et al.*, "Antiviral Activity of Phenolic Derivatives in Pyroligneous Acid from Hardwood, Softwood, and Bamboo," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 1, pp. 119–126, 2017.
- [164] E. L. Ellis and M. Delbrück, "The growth of bacteriophage," *J. Gen. Physiol.*, vol. 22, no. 3, pp. 365–384, 1939.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 18/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: *Escherichia coli* O157:H7 ELİMİNASYONU İÇİN DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİLEŞENLERİN VE BAKTERİYOFAJLARIN KULLANIMI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 18/07/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: ŞEFİKA EVRAN  
Öğrenci No: N16126161  
Anabilim Dalı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
Programı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

18.07.2019

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. İsmail H. Beyaz

(Unvan, Ad Soyad, İmza)



# ÖZGEÇMİŞ

## ŞEFİKA EVRAN

**Adres** Hacettepe Üniversitesi  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
Beytepe , 06800 , Ankara

**GSM** (539) 453 2401

**E-mail** [sefikaevran@hotmail.com](mailto:sefikaevran@hotmail.com)  
[sevrann09@gmail.com](mailto:sevrann09@gmail.com)

## Kişisel Bilgiler

**Cinsiyet** Bayan  
**Doğum Tarihi** 01.10.1991  
**Medeni Hal** Bekar  
**Ehliyet** B

## Eğitim

**Yüksek Lisans** **Hacettepe Üniversitesi - ANKARA**  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
06/2016 –

**Lisans** **Hacettepe Üniversitesi - ANKARA**  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
09/2010 – 06/2015

**Lise**

**Nalan Kaynak Anadolu Lisesi - DENİZLİ**

09/2005 – 06/2009

## **Deneyimler**

**Staj**

**Aynes Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.**

08/2014 - 09/2014

**Rol:** Gıda Mühendisi

**Ana görevler:** Ürün kalitesi ve kontrolü

**Seyran Gıda**

02/2014 - 02/2014

**Rol :** Gıda Mühendisi

**Ana görevler :** Ürün kalitesi ve kontrolü

## **Projeler**

**Hayvansal Bazlı Ürünlerde Tahşişin Belirlenmesi İçin Proteomik Esaslı Yeni Analitik Tekniğin Geliştirilmesi**

Nisan 2018 – Devam ediyor

**Çiğ Sütte *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* Fajlarının Raman Spektroskopisi ile Saptanması İçin Hızlı Bir Yöntemin Geliştirilmesi**

Mayıs 2017 - Şubat 2018

## **Patojen Bakterilerin Fajlarla (Faj Terapi ) ve Biyoaktif Bitki Antimikrobialleri ile Biyokontrolü Arasındaki Sinerjizmin Araştırılması: in vitro ve in vivo Denemeler**

Mart 2015 - Eylül 2017

### **Yayınlar**

1. İlhan, H., Guven, B., Dogan, U., Torul, H., **Evrans, S.**, Çetin, D., ... Tamer, U. (2019). The coupling of immunomagnetic enrichment of bacteria with paper-based platform. *Talanta*.

### **Organizasyonlar**

**ERASMUS + PROJECT -DROGEHAM /NEDERLAND, Multicultural exchange and organization of a cultural event**

Şubat 2015 – Şubat 2015

### **Araştırma alanları**

Gıda Kalitesi ve Güvenliği / Spektroskopik Yöntemler

Fajlar ve Faj Terapisi

### **Dil**

İngilizce

### **Referanslar**

Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Hacettepe Üniversitesi - ANKARA

Gıda Mühendisliği Bölümü

[ihb373@gmail.com](mailto:ihb373@gmail.com)

Tel : 0 312 780 61 46 – Gsm : (505) 284 8652