

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT ENDÜSTRİSİNDE TERMOFİLİK BAKTERİLERİN
BİYOFİLMLERİNİN KONTROLÜNDE DOĞAL
UYGULAMALAR

KÜBRA TUTKUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT ENDÜSTRİSİNDE TERMOFİLİK
BAKTERİLERİN BİYOFİLMLERİNİN
KONTROLÜNDE DOĞAL UYGULAMALAR

KÜBRA TUTKUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2021

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**NATURAL APPLICATIONS IN
CONTROLLING THE BIOFILM OF
THERMOPHILIC BACTERIA IN THE
DAIRY INDUSTRY**

KÜBRA TUTKUN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2021



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01/07/2021 tarih ve 2021/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/07/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kübra TUTKUN'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE : Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ÜYE : Dr. Öğr. Üye. Mehmet Selim ŞILBIR

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Yapılan tez çalışmasında, kuşburnu ekstraktlarının şeker içerikleri *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y ve *Paenibacillus sp.* 32O-W suşları üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri araştırıldı. Kuşburnu ekstraktları, farklı çözücüler ile hazırlanan kuşburnu solüsyonlarının iki farklı yöntem (mikrodalga aracılı ekstraksiyon, MAE ve ultrases aracılı ekstraksiyon, UAE) uygulanması ile elde edildi. Ekstraktların şeker miktarları HPLC analizi ile ölçüldü. Elde edilen ekstraktlar farklı oranlarda (1/1, 1/2, 1/4) ultra saf su ile seyreltildi ve ekstraktların *Paenibacillus* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırıldı. *Paenibacillus* suşlarının polistren yüzeyde biyofilm oluşturma potansiyeli laktoz içeren TSB besiyeri (TSB-L) ve süt içeren TSB besiyeri (TSB-S) kullanılarak incelendi. MAE yöntemiyle hazırlanan 1/2 sulandırma oranındaki etanol ekstraktının (E2-M2) antibiyofilm aktiviteleri ise polistren yüzeyde oluşturulan *Paenibacillus* suşlarının TSB-S besiyerindeki biyofilmleri üzerinde araştırıldı.

Kuşburnu ekstraktlarındaki toplam şeker oranlarının MAE ekstraktlarında UAE ekstraktlarından daha yüksek miktarda olduğu saptandı. *Paenibacillus* suşları üzerinde direkt uygulanan ekstraktların gentamisinden (10 µg/mL) daha etkili antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi. E2-M2 ekstraktının iki suş üzerinde yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve en az gentamisin kadar etkili olduğu saptandı. TSB-L besiyerinde *P. naphthalenovorans* 32O-Y'nin *Paenibacillus sp.* 32O-W'den ve TSB-S besiyerinde ise *Paenibacillus sp.* 32O-W'nin *P. naphthalenovorans* 32O-Y'den daha fazla biyofilm oluşturduğu belirlendi. E2-M2 ekstraktının *Paenibacillus sp.* 32O-W biyofilmlerinin ortadan kaldırılmasında etkisinin olmadığı, *P. naphthalenovorans* 32O-Y üzerinde genç biyofilmler üzerindeki etkisinin (% 58) olgun biyofilmler üzerindeki etkisinden (% 26) daha yüksek olduğu bulundu. Elde edilen sonuçlara göre, kuşburnu ekstraktlarının süt endüstrisi için zararlı olan termofilik bakteri biyofilmlerinin ortadan kaldırılması için kullanılan kimyasal dezenfektanlara karşı alternatif olma potansiyeli taşıdığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Paenibacillus naphthalenovorans*, *Paenibacillus sp.* 32O-W, kuşburnu, süt endüstrisi, antibakteriyel, antibiyofilm.

SUMMARY

In the thesis study, the antibacterial and antibiofilm effects and sugar contents of extracts obtained from rosehip fruit on *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y ve *Paenibacillus sp.* 32O-W strains were investigated. Rosehip extracts (E1-M, E2-M, E3-M, E1-U, E2-U ve E3-U) were obtained using different solvents (ethanol, methanol or distilled water) and extracted via two different methods (microwave assisted extraction, MAE and ultrasound asisted extraction, UAE). The contents of extracts were analyzed by HPLC. The antimicrobial effects of these extracts on thermophilic *Paenibacillus* strains were investigated by the well diffusion method. TSB medium containing lactose (TSB-L) and TSB medium containing milk (TSB-S) were used to observe the biofilm formations of *Paenibacillus* strains on the polystyrene surface. Antibiofilm activities of the 1/2 dilution of microwave assisted ethanol (E2-M2) extract were investigated on biofilms of *Paenibacillus* strains in TSB-S medium formed on the polystyrene surface.

The total sugar contents of the extracts were higher in rosehip extracts prepared by the MAE method than those obtained by UAE method. As a result of the antimicrobial analysis performed on thermophilic *Paenibacillus* strains, it was determined that the extracts were more effective than gentamicin (10 µg/mL). E2-M2 extract was found to be high and as effective as gentamicin on both strains. It was determined that *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y strain formed more biofilms in TSB-L medium than *Paenibacillus sp.* 32O-W strain, while *Paenibacillus sp.* 32O-W strain formed more biofilms than *P. naphthalenovorans* 32O-Y strain in TSB-S medium. It was found that E2-M2 extract did not remove *Paenibacillus sp.* 32O-W strain biofilms but removed young *P. naphthalenovorans* 32O-Y strain biofilms more effectively (58%) than mature biofilms (26%). As a result, it was determined that rosehip extracts have the potential to be an alternative to chemical disinfectants used to eliminate thermophilic bacterial biofilms that are harmful to the dairy industry.

Keywords: *Paenibacillus naphthalenovorans*, *Paenibacillus sp.* 32O-W, rosehip, dairy industry, antibacterial, antibiofilm.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimdeki staj sürecimden itibaren bilgi ve birikimiyle beni yönlendiren, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince ise tecrübesiyle çalışmalarına destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a,

Lisans ve lisansüstü eğitimimde yol göstericiliği ve manevi desteklerinden dolayı Arş. Gör. Gamze ŞEKER'e,

Yüksek lisans çalışmalarımda desteklerinden dolayı Elif KALPAR, Sezin ADINIR, Murat ÖZTÜRK ve GTÜ Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma,

Desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda bildiğim meslektaşım, yol arkadaşım Cüneyt AKDENİZ'e,

Son olarak hayatım süresince her kararında beni destekleyen, her daim bana yol gösterip sevgisini hissettiren canım aileme teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması 2020-A-101-06 proje numarası ile Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyofilm	3
2.2. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri	6
2.2.1. <i>Paenibacillus sp.</i> 'nin Genel Özellikleri	6
2.3. Süt Endüstrisinde Termofilik Mikroorganizmaların Oluşturduğu Biyofimlir ve Biyofilmlerin Etkileri	8
2.4. Süt Endüstrisinde Kullanılan Genel Temizlik ve Dezenfeksiyon İşlemleri	10
2.4.1. Süt Endüstrisinde Dezenfektan Kalıntıları ve Neden Olabileceği Sorunlar	13
2.4.2. Biyoaktif Bileşiklerin Gıda Endüstrisinde Dezenfektan Olarak Kullanımı	13
2.5. Doğal Ekstraksiyon Yöntemleri	14
2.6. Kuşburnu	17
2.6.1. Kuşburnunun Özellikleri	17
2.6.2. Kuşburnunun Ülkemizde ve Dünyada Kullanımı	18
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	20
3.1. Gereçler	20
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	20
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	20
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	21

3.2. Yöntemler	22
3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Sterilizasyonu	22
3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Saklanması	22
3.2.3. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	22
3.2.4. Kuşburnu Meyvesinin Ekstraksiyonu	23
3.2.5. Kuşburnu Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Deneyleri Öncesi Hazırlanması	25
3.2.6. Kuşburnu Ekstraktlarının pH Analizi	26
3.2.7. Kuşburnu Ekstraktlarında Bulunan Şeker Bileşenlerinin Analizi	27
3.2.8. Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi	27
3.2.9. Farklı Besiyerleri Varlığında Oluşumu	27
3.2.10. TSB-S Besiyerinde Biyofilm Oluşumunun Ortadan Kaldırılması (%)	30
3.2. İstatiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Farklı Kuşburnu Ekstraktlarında Bulunan Şeker Miktarının Belirlenmesi	33
4.2. Kuşburnu Ekstraktlarının pH Değerinin Belirlenmesi	34
4.3. Kuşburnu Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi	35
4.4. TSB-L Besiyerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi	39
4.5. TSB-S Besiyerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi	41
4.6. TSB-S Besiyerinde Biyofilm Oluşumunun Ortadan Kaldırılması	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	73
EKLER	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
BF	: Biyofilm oluşan kuyulardaki ortalama absorbans değeri
B	: Bakteri kültürü içermeyen besiyeri
CIP	: Yerinde Temizleme (Cleaning in Place)
COP	: Yerinden Ayırarak Temizleme (Cleaning Out of Place)
Dsu	: Distile su
E	: Ekstrakt muamelesi sonucu oluşan ortalama absorbans değeri
E1-M	: MAE yöntemiyle % 100 Dsu çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktı
E1-U	: UAE yöntemiyle % 100 Dsu çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktı
E2-M	: MAE yöntemiyle % 50:50 EtOH:Dsu çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktı
E2-U	: UAE yöntemiyle % 50:50 EtOH:Dsu çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktı
E3-M	: MAE yöntemiyle % 50:50 MeOH:Dsu çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktı
E3-U	: UAE yöntemiyle % 50:50 MeOH:Dsu çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktı
EB	: Bakteri kültürü içermeyen besiyerinin ekstrakt ile muamelesi sonucu oluşan absorbans değeri
EPS	: Ekzopolisakkaritler
EtOH	: Etanol, etil alkol
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
g	: Gram
GHz	: Gigahertz. 10 ¹¹ hertz olan bir frekans birimidir.
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
K	: Klor solüsyonu

kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
MeOH	: Metanol, metil alkol
mg	: Miligram
MHz	: MegaHertz. 10^6 hertz olan bir frekans birimidir.
MAE	: Mikrodalga Aracılı Ekstraksiyon
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
NaCl	: Sodyum klorür
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
ppm	: Milyonda bir birim
PS	: Polistiren yüzey
RID	: Refraktif İndeks Dedektörü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
TFB	: Toplam Fenolik Bileşik
TSA	: Triptik Soya Agar
TSB	: Triptik Soya Sıvı Besiyeri
TSB-L	: % 4 Laktoz İçeren TSB Besiyeri
TSB-S	: % 4 Laktoza Eşdeğer Süt Tozu İçeren TSB Besiyeri
UAE	: Ultrases Aracılı Ekstraksiyon
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Ağırlık
W	: Watt, güç birimi, joule/saniye

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyofilm oluşum ve olgunlaşma aşamaları.	3
2.2: Tedarik zincirince çiğ sütün kontaminasyon kaynakları.	9
2.3: UAE yönteminin uygulanma aşamaları.	16
3.1: Ekstraktların elde edilmesi, ekstraktlardaki bileşenlerin analiz yöntemleri, ekstraktların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi aşamaları.	26
3.2: Kuşburnu ekstraktlarının <i>Paenibacillus sp.</i> 32O-W, <i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> 32O-Y suşları üzerindeki antibiyofilm etkilerinin incelenmesinde uygulanan aşamalar (PS: polistren yüzey).	28
4.1: MAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-M, E2-M ve E3-M) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) <i>Paenibacillus sp.</i> 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin).	36
4.2: UAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-U, E2-U ve E3-U) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) <i>Paenibacillus sp.</i> 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkileri. (G: Gentamisin).	37
4.3: MAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-M, E2-M ve E3-M) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) <i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkileri. (G: Gentamisin).	38
4.4: UAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-U, E2-U ve E3-U) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) <i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkileri. (G: Gentamisin).	39
4.5: <i>Paenibacillus</i> suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-L besiyeri içerisinde 24 ve 72 saat inkübasyonu sonucu oluşan biyofilm absorbands değerleri (570 nm).	40

- 4.6: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-S besiyeri içerisinde 24 ve 72 saat inkübasyonu sonucu oluşan biyofilm absorbans değerleri (570 nm). 42
- 4.7: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-S besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan biyofilmin E2-M2 ekstraktı ve klor uygulaması ile ortadan kaldırılma (%) oranları. 43
- 4.8: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-S besiyerinde 72 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan biyofilmin E2-M2 ekstraktı ve klor uygulaması ile ortadan kaldırılma (%) oranları. 44

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Yaygın olarak kullanılan dezenfektanlardaki kimyasal ve fiziksel özelliklerin karşılaştırılması.	12
2.2: Yeşil ekstraksiyon yöntemlerinin ilkeleri.	15
3.1: MAE ve UAE yöntemleri ile kuşburnu ekstraktlarının hazırlığında kullanılan çözücü oranları ve ekstraksiyon süreleri.	24
3.2: MAE ve UAE yöntemleriyle hazırlanan ekstraktların kullanılan çözücü ve seyreltme oranlarına göre isimlendirilmesi (MAE: Mikrodalga Aracılı Ekstraksiyon, UAE: Ultrases Aracılı Ekstraksiyon, Dsu: Distile Su, EtOH: Etanol, MeOH: Metanol).	25
4.1: Farklı çözücü ve yöntemlerle hazırlanan kuşburnu ekstraktlarındaki glukoz ve fruktoz miktarının HPLC analizleri ile belirlenmesi.	34
4.2: UAE ve MAE yöntemiyle ve farklı çözücüler ile hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının 45 °C sıcaklıktaki pH değerleri.	35

1.GİRİŞ

Biyofilm bir yüzeye bağlı bulunabilen veya bir yüzeye yapışmadan topluluk oluşturabilen karmaşık mikroorganizma topluluklarıdır ve bakteriler onları korunaklı bir şekilde kalabilmesini sağlayan hücre dışı matriks (EPS) içerisinde yer almaktadır [Roy et al., 2018]. Biyofilm oluşumunda genel olarak, hidrofobik ve pürüzlü yüzeyler, hidrofilik ve pürüzsüz olanlara göre bakteriler tarafından tercih edilir [Donlan, 2002]. Özellikle paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşumu yüzey pürüzlülüğünden etkilenmektedir [Kukhtyn et al., 2017b]. Termofilik bakterilerin yüzeye yapışması ise yüzey türüne göre değişmektedir [Karaca et al., 2019]. Termofilik bakteriler, endüstriyel işleme hatlarında özellikle paslanmaz çelik yüzeye bağlanıp büyür ve ortamda vejetatif form veya hücre kümeleri halinde üreme potansiyeline sahiptir [Palmer et al., 2010].

Süt endüstrisinde ekonomik kayıplara sebep olan en büyük sorun biyofilm oluşumudur. Süt endüstrisinde kullanılan ekipmanların temizliği ürün kalitesini etkilemektedir [Öksüztepe ve Demir, 2019]. Süt ekipmanlarının sterilize edilmesi sırasında bakteriler hayatta kalabilmektedir ve süt ürünleri ekipmanlarını verimli bir şekilde sterilize etmek için biyofilmlerdeki bakterileri etkileyen dezenfektanların kullanılması önem taşımaktadır [Kukhtyn, et. al. 2017a].

Bitkiler ve doğal gıdalar, bakteriyel biyofilm oluşumu ve gelişimi üzerindeki yapılan inhibitör etki çalışmaları sonucunda bakteriyel enfeksiyonlar için alternatif ajanlar olma potansiyel taşımaktadır [Lu et al., 2019]. Doğal antibiyofilm ajanlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi, bakterilerin oluşturduğu zararların kontrolü üzerinde fayda sağlayıcıdır [Mishra et al., 2020; Lu et al., 2019].

Bu tez çalışmasında, kuşburnu meyvesinin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların, termofilik *Paenibacillus* suşları üzerinde biyofilm oluşumlarının kontrolünde doğal bir antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Süt endüstrisinde biyofilm oluşumu ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Biyofilm, çiğ sütün toplanmasından atık işlemeye kadar süt ürünü üretiminin tüm aşamalarında meydana gelebilmektedir. Termofilik bakteriler ortamdaki üremeye uygun sıcaklık nedeniyle sütte kontaminasyona neden olan seviyelere kısa sürede ulaşabilmektedir.

Üretilen süt ve süt ürünlerinin kalitesi çiğ süt kalitesinden etkilenmektedir ve bu sebeple çiğ sütün kalitesi, taşındığı, depolandığı alanların temizliği önemlidir. Süt ve süt ürünlerine klor veya fenol temelli deterjan ve dezenfektanların bulaşması sonucuyla bu kimyasalların anne sütüne geçmesi [Dervişoğlu ve ark., 2013], süt veya süt ürününün tadını değiştirmesi ve süt ürünlerinin fermantasyonunu engellenmesi [Karagözlü ve Karagözlü, 2004] gibi durumlarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle daha ekonomik, çevre dostu ve doğal bileşik arayışı kaçınılmaz olmaktadır. Doğal bileşikler çevre açısından güvenli olduğundan, kolay elde edilebilmektedir ve zararlı kimyasallara karşı alternatif olabilmektedir.

Kırmızı meyve ve meyve atıklarının içerisinde yüksek miktarda biyoaktif bileşik bulunmaktadır. Kırmızı meyve özütleri içerisindeki biyoaktif maddelerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi ile patojenik bakterilere karşı kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Kırmızı meyveler gıda olarak kullanılmasının yanı sıra çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak ve kozmetik amaçlarla da kullanılabilir.

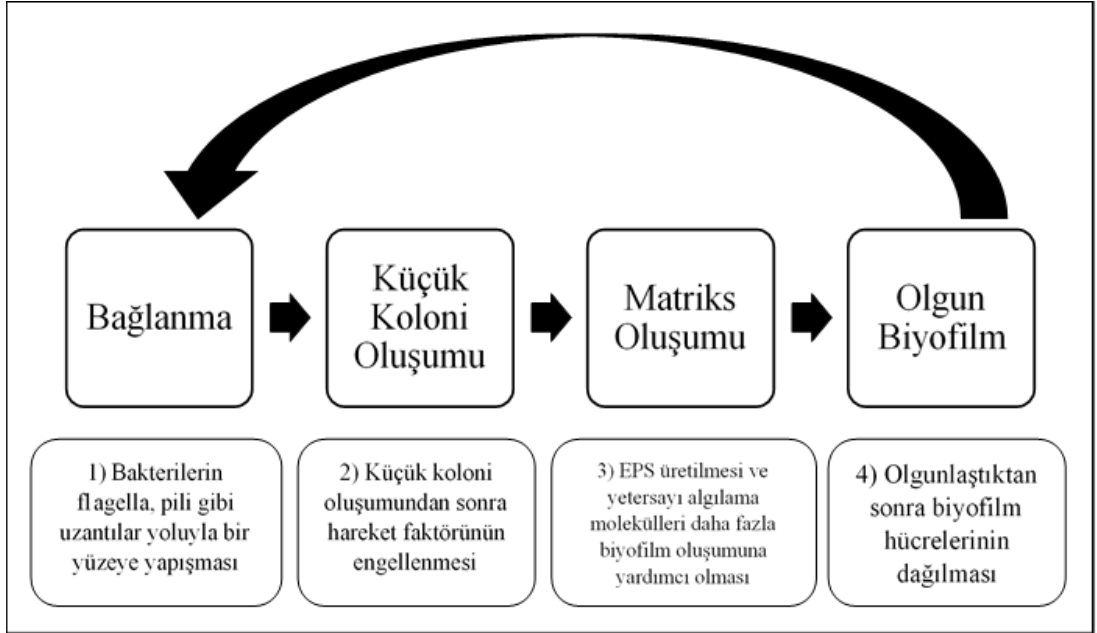
Bu tez çalışmasında termofilik *Paenibacillus sp.* 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y suşları üzerinde kuşburnu ekstraktlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, kuşburnu meyvesinde bulunan biyoaktif bileşiklerin ortaya çıkarılmasında uygulaması kolay, az zaman alan ve uygulama sonrası en verimli sonucu verecek şekilde elde edilmesi için farklı ekstraksiyon metotları kullanılmıştır. Ekstraktların bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkileri kuyu difüzyon metodu ile, antibiyofilm etkisi ise polistren yüzeyde oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması çalışmaları ile incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilm

Biyofilmler; biyotik ve abiyotik katı yüzeylere tutunan ve hücrelerin kendi ürettiği hücre dışı polisakkarit, DNA ve proteinlerden oluşan matriks ile çevrili mikrobiyal topluluklar olarak bilinmektedir [Sadiq et al., 2017b; Wingender et al., 2001]. Aynı zamanda biyofilmler, endüstriyel alanlarda mikroorganizmaların çoğalabildiği ve çoğaldığı yüzeyde termal olarak kararlı enzim ve sporlar üretebildiği yaşam formudur [Sadiq al., 2017b].

Genel olarak biyofilm oluşum aşamaları; yüzeye bağlanma, küçük koloni oluşumu, matriks oluşumu ve biyofilm olgunlaşması olarak Şekil 2.1’de verilmiştir [Banerjee et al., 2019’dan değiştirilmiştir].



Şekil 2.1: Biyofilm oluşum ve olgunlaşma aşamaları.

Biyofilm oluşumu ve olgunlaşma aşamaları temelde dört aşamadan oluşmaktadır:

- Bağlanma; serbest haldeki bakteriler yüzeye yapışır.
- Küçük kolonilerin oluşumu; hücrelerin çoğalması ile küçük koloni oluşur ve hücrelerin hareketi engellenir.

- Matriks oluşumu; hareketin engellenmesi ve daha fazla EPS oluşumu ile yeterli çoğunluk algılanması (quorum sensing) ve olgun biyofilm oluşumu sağlanır.
- Olgun biyofilm; hücrelerin bir kısmının biyofilm tabakasından salınması ile ortama yayılması sağlanır.

Mikroorganizmaların bulunduğu ortamın besin içeriği biyofilm oluşumunu etkilemektedir [Sar and Akbas, 2019; Karaca, 2018; Tolker-Nielsen, 2015]. Farklı biyofilmler, farklı fiziksel ve kimyasal özellikler sergilemektedir [Tolker-Nielsen, 2015; Heydorn et al., 2000]. Ayrıca serbest durumdaki bakterilerin ve biyofilm içerisinde yer alan bakterilerin gen ekspresyonları birbirlerinden farklıdır [Kot, et al., 2018; Tolker-Nielsen, 2015]. Hücreler, biyokimyasal sinyal molekülleri aracılığı ile hücreler arası iletişim kurarak aralarında uyum sağlamaktadır [Solano et al., 2014; Borlee et al., 2010; Flemming and Wingender, 2010; De Kievit, 2009; Hammer and Bassler, 2003]. Hücreler arası iletişim mekanizması (yeterli çoğunluk algılama) ve ikincil mesajcı siklik di-GMP molekülleri biyofilm ve matriks üretiminde rol oynamaktadır [Sadiq et al., 2017a; Solano et al., 2014; Borlee et al., 2010; De Kievit, 2009; Hammer and Bassler, 2003].

Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar, kendi ürettikleri hücre dışında yer alan ve biyofilmin yaklaşık % 90'ını oluşturan ekzopolisakkarit (EPS) matrisinde yaşamaktadır [Flemming and Wingender, 2010]. EPS esas olarak su, polisakkarit, protein, nükleik asitler ve lipitten meydana gelmektedir [Flemming and Wingender, 2010]. EPS, biyofilm oluşumu için gereklidir ve serbest halde yaşayan bakterilere farklı bir yaşam biçimi sağlamaktadır [Flemming and Wingender, 2010]. Biyofilmlerdeki bakterileri birbirine bağlayan EPS bileşenleri arasındaki farklılıklar, farklı biyofilm yapılarının oluşmasına neden olmaktadır [Tolker-Nielsen, 2015].

EPS'nin biyofilmler içerisinde birçok görevi vardır ve biyofilmlere yarar sağlamaktadır [Flemming and Wingender, 2010]. Bunlar:

- Hücrelerin yüzeye tutunmasını ve yapışmasını sağlamak.
- Hücreler arasında iletişimi kolaylaştırmak, hücre-hücre tanınmasını sağlamak.
- Biyofilmin üç boyutlu yapısını oluşturmak.
- Bakterilerin etrafında yüksek oranda hidratlanmış bir mikro ortam sağlayarak, su kaybına karşı biyofilmi korumak.

- Enfeksiyona karşı hücrelere direnç kazandırmak ve çeşitli antimikrobiyal ajanlara (örneğin, dezenfektanlar ve antibiyotikler) karşı tolerans sağlamak.
- UV, radyasyon, farklı pH koşulları, ozmotik basınç gibi faktörlere karşı bakterileri korumak.
- Çevreden besinlerin alınıp biyofilm içinde birikmesine izin vermek.
- Besin alımı için dışsal makromoleküllerin sindirilmesini ve yapısal EPS'nin parçalanmasını sağlayarak hücrelerin biyofilmlerden salınmasını sağlamak.
- Biyofilm hücreleri arasında yatay gen transferini kolaylaştırmak olarak sıralanabilir.

Bakteriler paslanmaz çelik, polistiren, cam, kauçuk, ahşap gibi farklı yüzeylerde ve gıdalarda biyofilm oluşturma eğiliminde olmaktadır [Srey et al., 2013; Djordjevic et al., 2002]. Bakteriler, yüzey pürüzlülüğü, yüzey kimyası, yüzey yükü ve hidrofobiklik derecesi gibi farklı nedenlerle yüzeylere daha kolay veya daha zor yapışabilmektedir [Sadiq et al., 2017b]. Hücre yüzeyi hidrofobikliği bakterilerin bağlanmasıyla doğrudan ilişkili olmaktadır [Jindal and Anand, 2018]. Biyofilm oluşumunda genel olarak, hidrofobik malzemeler ve pürüzlü yüzeyler, hidrofilik ve pürüzsüz olanlara göre bakteriler tarafından tercih edilmektedir [Donlan, 2002].

Termofilik bakterilerin yüzeye yapışması yüzey türüne göre değişmektedir [Karaca et al., 2019]. Örneğin; Flint ve arkadaşlarının (2001) çalışmasında *G. stearothermophilus*'un paslanmaz çelik yüzey üzerindeki biyofilm oluşumu ile aynı yüzeyin süt proteinleri ile kaplanması sonucunda oluşan biyofilmi kıyaslamışlar ve kontamine olmuş paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm oluşumunun arttığını (10 ila 100 kata kadar) göstermişlerdir. Modifiye edilmiş paslanmaz çelik yüzeylerde termofilik bakteri biyofilmlerinin oluşumunun ise azaldığı gözlemlenmiştir [Jindal et al., 2016]. Spor oluşturan termofilik bakterilerin vejetatif hücrelerine kıyasla, sporlarının paslanmaz çelik yüzeye bağlanma yeteneği daha fazla olmaktadır [Jindal and Anand, 2018; Flint et al., 2001]. Yüzeylerin fizikokimyasal özellikleri ile beraber yüksek inkübasyon sıcaklığı da biyofilm bağlanmasında etkin olduğu görülmüştür [Karaca, 2018]. Karaca (2018)'nın yaptığı çalışmada, 55 °C sıcaklıkta *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsine ait bakteriler tam yağlı süt ortamında hidrofilik yüzeylere (cam, paslanmaz çelik) bağlanmayı tercih ederken, termofilik bakteriler aynı besin

koşullarında 65 °C sıcaklıkta ise hidrofobik yüzeylere (polistren, polipropilen) bağlanmayı tercih ettiği görülmüştür.

2.2. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri

2.2.1. *Paenibacillus sp.*'nin Genel Özellikleri

Bacillus cinsi, Gram-pozitif, aerobik veya fakültatif (seçmeli) anaerobik, spor oluşturan çubuk şeklindeki mikroorganizmalardan oluşmaktadır ve sıra dışı şartlarda yaşayan bakterileri de kapsamaktadır [Ash et al., 1991; Claus and Fritze, 1989]. 16S rRNA dizileme yöntemi ile yapılan analiz sonucunda *Bacillus* cinsinin 5 ayrı kümeye ayrılarak heterojen bir topluluk olduğu belirlenmiştir [Ash et al., 1991]. *Paenibacillus* cinsine ait bakterilerin yapılan filogenetik analizler sonucu *Bacillus* genusunun alt türü olduğu belirlenmiştir [Ash et al., 1993]. *Paeni* kelimesi Latince “neredeyse” demektir ve *Paenibacillus* “neredeyse bir *Bacillus*” anlamına gelmektedir [Ash et al., 1993]. 16S rRNA dizileme analizi sonucunda *Paenibacillus*'un, *Paenibacillaceae* familyasında yer aldığı belirlenmiştir [de Vos and Garrity, 2009]. *Paenibacillus* suşları çubuk şeklinde, Gram pozitif veya Gram negatif olabilmektedir [Shida, 1997; de Vos and Garrity, 2009]. Bu suşlar, kamçıları sayesinde hareketli olmaktadır, aerobik veya seçmeli anaerobik olabilir ve endospor oluşturmaktadır [de Vos and Garrity, 2009]. *Paenibacillus*, agar üzerinde küçük, saydam, açık kahverengi-beyaz, pembe-sarımsı renkte koloniler üretmektedir [de Vos and Garrity, 2009]. *Paenibacillus* türleri birbirinden farklı habitatlarda yaşamaktadır ve toprak, su, bitki rizosferi, gıda ve böcek larvaları gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir [Grady et al., 2016; Daane et al., 2002].

Paenibacillus suşları sahip oldukları özelliklerle çeşitli alanlarda kullanıma potansiyeli taşımaktadır. Bitki büyüme desteği [Han et al., 2014] ve çeşitli patojen canlılara karşı biyokontrol [Duval et al., 2015; Zhou et al., 2008] sağlamaktadır. *Paenibacillus* cinsinin ürettiği enzimler ve antimikrobiyal peptitler, tarım [Abriouel et al., 2011], biyoremediasyon [Saxena et al., 2015; Wang et al., 2015] alanlarında kullanıma potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca *Paenibacillus* türlerinin ürettiği enzimlerin deterjan, gıda, tekstil, kağıt, biyoyakıt endüstrileri gibi farklı alanlarda kullanıma potansiyelinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır [Grady et al., 2016].

Paenibacillus suşları yararlı etkilerinin yanı sıra olumsuz etkilere de sebep olabilmektedir. Örneğin; insanlarda enfeksiyonlara sebep oldukları bildirilmiştir [DeLeon and Welliver, 2016]. Bir diğer iyi bilinen olumsuz yönleri ise süt ve süt ürünlerinin bozulmasındaki rolleridir. *Paenibacillus* suşları, süt endüstrisinde sütün bozulmasına neden olan enzimleri üreten en önemli bakterilerden biridir [Olajide and LaPointe, 2020; Ranieri et al., 2012; Scheldeman et al., 2004]. *Paenibacillus* türleri lipit ve protein hidrolizi yollarıyla uzun raf ömrüne sahip sütlerin bozulmasına sebep olabilecek potansiyel taşıyıcıdır [Mugadza and Buys, 2018]. *Paenibacillus* türleri yüksek ve düşük sıcaklıklarda süt için tehlike arz etmektedir, genel olarak düşük sıcaklıklara da adapte olabilmektedir ve pastörize edilmiş sütte de izole edilebilmektedir [Beno et al., 2020]. Düşük sıcaklıklarda gelişebilen birçok *Paenibacillus* suşu ve yaklaşık 10 günlük buzdolabı sıcaklığında saklanması ardından çiğ sütteki bakterilerin büyük çoğunluğunu oluşturabilmektedir [Gopal et al., 2015]. Bu bakterilerin endosporları pastörizasyon işlemine dayanıklıdır ve endüstriyel ekipmanlarda da yaşamlarına devam edebilmektedir. Bu nedenle hem çiğ hem de pastörize sütte az miktarda da olsa *Paenibacillus* sp. bulunabilmektedir [Gopal et al., 2015; Ranieri et al., 2012]. Sütten izole edilen her *Paenibacillus* türü aynı etkiyi göstermiyor olsa da proteaz, lipaz ve fosfolipaz enzimlerinin etkinliği ile süt ve süt ürünlerinin tadını ve kokusunu olumsuz etkilemektedir [Olajide and LaPointe, 2020; Grady et al., 2016; Gopal et al., 2015; Trmčić et al., 2015].

Wang ve arkadaşlarının (2015), biyodesülfürizasyon potansiyeline sahip termofilik kültürleri tanımlama ve karakterize etmek için yaptıkları çalışmada 320 adlı kültürü kullanmışlar ve çalışma sonucunda bu kültürden iki *Paenibacillus* türü izole etmişlerdir. Bu iki türe 320-W ve 320-Y adlandırmaları yapılmıştır.

Paenibacillus naphthalenovorans, Gram-pozitif, çubuk şekline sahip, hareketli, spor oluşturan, zorunlu aerobik bir bakteri suşudur [de Vos & Garrity, 2009]. Agar üzerinde büyütüldüğünde beyaz, yarı saydam, mukoid (öze değdirildiğinde iplik gibi uzayan) koloniler oluşturmaktadır [Daane et al., 2002]. *P. naphthalenovorans* naftalin tükettiği için bu ismi almıştır ve aromatik hidrokarbonların biyoyıkımını sağlamaktadır [Daane et al., 2002]. Delaunay et al. (2021)'ın yaptıkları çalışma ile *Paenibacillus naphthalenovorans*'ın sütte ilk kez izole edildiği bildirilmiştir.

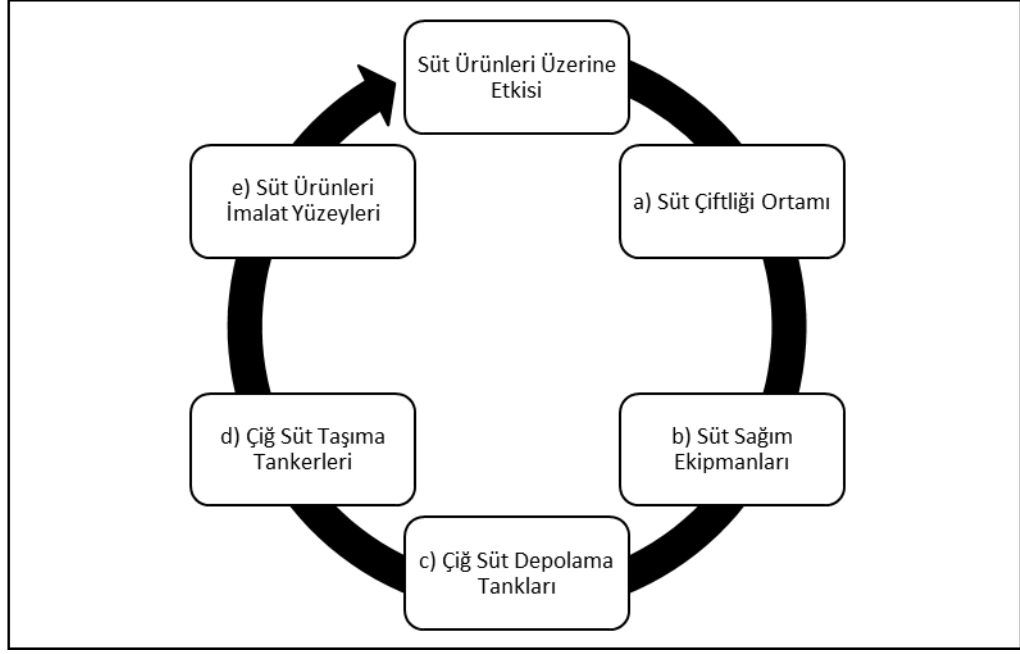
Paenibacillus sp. 320-W, 16S rDNA dizilimi ile *Paenibacillus* olarak tanımlanmıştır, fakat ait olduğu tür belirsizdir. [Wang et al., 2015]. *Paenibacillus* sp. 320-W, dibenzotiofen türevlerini metabolize edememektedir, fakat *Paenibacillus*

naphthalenovorans 32O-Y ile *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunun yapabildiğinden daha hızlı şekilde dibenzotiofen türevlerini metabolize edebilmektedir [Butler et al., 2016; Wang et al., 2015]. *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y ve *Paenibacillus* sp. 32O-W bakterilerinin sinerjistik aktivitesi biyodesülfürizasyon amaçlı farklı mikrobiyal çalışmalarda model olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır [Sar et al., 2020; Wang et al., 2015].

2.3. Süt Endüstrisinde Termofilik Mikroorganizmaların Oluşturduğu Biyofimler ve Biyofilmlerin Etkileri

Süt; protein, yağ, karbonhidrat ve minerallerden oluşmaktadır. Yağ, yağ küreciklerinden meydana gelirken karbonhidrat ise laktoz adı verilen glukoz ve galaktozdan oluşan disakkaritten meydana gelmektedir. Süt protein kısmının yaklaşık % 80'nini de kazein oluşturmaktadır. Süt içerisindeki kimyasal reaksiyonlar sonucu süt ürünleri meydana gelmektedir [Teh et al., 2015]. Çiğ süt, uygun olmayan taşıma-saklama sıcaklığı, mikrobiyal kirleticiler, doğal olarak oluşan enzimler nedeniyle çabuk bozulan bir üründür [Teh et al., 2015]. Çiğ sütün kalitesi ürün verimini, işlevselliğini, acılık ve ekşilik gibi duysal kusurların oluşumunu etkileyerek süt ürünlerinin üretimi üzerinde büyük bir etkiye sahip olmaktadır [Flint et al., 2020; Singh et al., 2019; Teh et al., 2015; Zhao et al., 2013].

Çiğ sütün işlendiği ekipmanlarda düşük sıcaklıklarda üreyebilen (psikrotrof) bakterilerin gelişimi ve üretim tesisinin sıcak bölgelerinde spor oluşturan termofilik bakterilerin üremesi endişe yaratmaktadır [Flint et al., 2020]. Çiğ sütteki mikroorganizmalar çeşitli kaynaklardan gelmektedir (Şekil 2.2) [Teh et al., 2015'den değiştirilerek uygulanmıştır]. Bu kaynaklardan gelen mikrobiyal yük patojenik ve bozucu mikroorganizmaların yanı sıra probiyotik bakterileri de kapsayan faydalı bakterileri de içerebilmektedir [Teh et al., 2015].



Şekil 2.2: Tedarik zincirince çiğ sütün kontaminasyon kaynakları.

Süt endüstrisinde biyofilm oluşumu, düşük kalite/verim, gıda bozulmaları veya gıda güvenliği sorunları ve temizlik ve hijyenin sağlanmasında zorluklar nedeniyle ekonomik kayıplara neden olmaktadır [Teh et al., 2015]. Biyofilm olarak adlandırılan yüzeylerdeki bakterilerin sebep olduğu kirlilik, çiğ sütün toplanmasından atık işlemeye kadar süt ürünü üretiminin tüm aşamalarında meydana gelmektedir [Flint et al., 2020]. *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus flavithermus* türleri genel olarak sütte spor oluşturan türler olarak bilinmektedir [Delaunay et al., 2021]. Tam yağlı süt tozu üretimi sırasında tank, ön buharlaştırıcı, ön ısıtma bölümlerinde *Geobacillus*'a ait vejetatif hücre büyümesi ve spor oluşumu görülmektedir [Scott et al., 2007].

Gıdayla temas eden yüzeylerde biyofilm oluşumu; süt tortusunun birikimi, bakterilerin yapışması ve kolonizasyonu ve son olarak da biyofilm oluşumu aşamalarıyla sonuçlanmaktadır [Jindal et al., 2016]. Biyofilm tabakasını oluşturan ve oluşan EPS içerisindeki bakteriler ısıtma işlem ve dezenfeksiyon işlemlerinde hayatta kalabilmekte ve bunun sonucunda kontaminasyon kaynağı olarak süt ürünlerinin kalitesini ve güvenliğini tehdit etmektedir [Jindal et al., 2016]. Ayrıca süt endüstrisinde boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olabilmekte ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular ve diğer süt işleme ekipmanları korozyona uğrayabilmektedir [Gün ve Ekinçi, 2009].

Termofilik basiller sütte önemli bir kontaminasyona neden olan seviyelere kısa sürede ulaşabilmektedir [Flint et al., 2001]. Termofilik bakteri biyofilmlelerinde yüksek sıcaklık ve yüksek inkübasyon süresi biyofilm oluşumunu arttırmaktadır [Cihan et al., 2017]. Biyofilm oluşumunu mikroorganizmaların bulunduğu ortamın besin içeriği de etkilemektedir [Sar and Akbas, 2019; Karaca, 2018]. Tam yağlı sütte *Geobacillus*'un hem yüzeye bağlanması hem de spor oluşturmaları, yarı yağlı veya yağsız süte göre daha yüksek olabilmektedir [Karaca et al., 2019]. Ayrıca, süt işleme alanlarında farklı yüzeylerde oluşan biyofilmlemlerin ortadan kaldırılması biyofilm oluşumunun erken aşamalarda mümkün olurken, kritik evrenin aşılması durumunda termofilik bakterilerin biyofilmlemlerinin giderimi için dezenfeksiyon işlemleri sonuç vermeyebilmektedir. Bu nedenle süt ürünlerinin işlendiği yüzeylerde, termofilik biyofilm oluşumunun hızlanmaya başladığı evre öncesinde düzenli dezenfeksiyon işleminin uygulanması önemlidir [Karaca, 2018].

2.4. Süt Endüstrisinde Kullanılan Genel Temizlik ve Dezenfeksiyon İşlemleri

Dünya üzerinde süt ve süt ürünlerinin tüketiminin artması süt endüstrisinin gelişmesine yol açmaktadır. Gelişen süt endüstrisi neticesinde birçok süt ürünü üretilmektedir. Üretilen pastörize süt, peynir, tereyağı gibi ürünlerin kalitesi çiğ süt kalitesinden etkilenmekte ve bu sebeple çiğ sütün kalitesi ve taşındığı, depolandığı alanların temizliği önemli olmaktadır [Teh et al., 2015]. Süt kalitesini artırma yöntemleri ülkelere göre farklılık gösterirken genel olarak mikrobiyal yük düşük tutularak süt kalitesi artırılmakta ve mikrobiyal büyümeyi engellemek için süt düşük sıcaklıklarda saklanmaktadır [Teh et al., 2015].

Temizlik, dezenfeksiyondan önce yapılarak ortamın mikrobiyal yükünü azaltıp dezenfeksiyonun etkisini arttırmaktadır ve temizlik ile dezenfeksiyon işlemleri birbirlerini tamamlayıcıdır [Fukuzaki, 2006]. Temizleme aşamasında birbirinden farklı amaçlar için kullanılan ve deterjan olarak adlandırılan maddeler kullanılmaktadır. Bunlar alkali bileşikler, asit bileşikler, nötral temizleyiciler, şelat oluşturan bileşikler olarak sınıflandırılmaktadır [Karagözlü ve Karagözlü, 2004]. Gıda endüstrisinde yerinden ayırarak temizleme (Cleaning Out of Place = COP) sistemi kullanılıyor olsa da süt endüstrisinde yerinde temizlik sistemi (Clean in Place = CIP) daha sık kullanılmaktadır [Norton and Tiwari, 2013]. Süt endüstrisinde CIP sistemi ile

etkili dezenfeksiyon sağlanmaktadır [Tiwari et al., 2013; Srey et al., 2013; Karagözlü ve Karagözlü, 2004]. Süt endüstrisinde her üretim sonrasında düzenli temizlik ve dezenfeksiyon işleminin yapılması zorunludur ve işlemin başarılı olması için aşağıda verilen aşamalara dikkat edilmelidir [Karagözlü ve Karagözlü, 2004].

- Ürün kalıntılarının uzaklaştırmak için mekanik ön temizleme.
- Kirlerin büyük bölümünü uzaklaştırmak için su ile ön durulama.
- Deterjan bileşenleri ile temizlik uygulaması.
- Dezenfeksiyon uygulaması.
- Kimyasalları uzaklaştırmak için kaliteli temiz su ile bir veya daha fazla sayıda durulama işlemi.
- Alet ve ekipmanların yüzeyinden suyun iyice süzülmesi, kurulanması.

Dezenfektanların etkinliği dezenfektanın konsantrasyon ve temas süresi, ortamdaki pH, sıcaklık, su sertliği, ortamda organik madde ve kimyasal inhibitör varlığı unsurlarından etkilenmektedir [Srey et al., 2013]. Dezenfektanların uygulanma süresi genel olarak 2-10 dakika arasında değişmektedir [Karagözlü ve Karagözlü, 2004]. Kimyasal dezenfektan türleri klor bazlı, iyot gazı, asit-anyonik dezenfektanlar ve peroksitler olarak sınıflandırılabilir [Schmidt, 1996]. Yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar ve özellikleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir [Schmidt, 1996].

Sütün geçtiği ve beklediği işleme hattının sıcaklığı, sütün işleme hattında beklemesi veya akışta olması ortamdaki mikroorganizmaların biyofilm oluşumunu etkileyen unsurlardandır [Ayhan, 2016]. Sütlerin kabul edildiği bölümden başlayarak, süt muhafaza tankları da dahil olmak üzere tüm işleme ekipmanlarının uygun hijyen ve dezenfeksiyon uygulamaları düzenli olarak yapılmalıdır [Ayhan, 2016].

Süt ürünleri ekipmanının etkili bir şekilde hijyenik olması için yüzey üzerinde oluşan biyofilmlerdeki bakterileri etkileyen dezenfektanların kullanılması gerekmektedir [Kukhtyn et al., 2017a]. Kullanılan temizlik maddesinin fosfat içerikli olması *Geobacillus* sporlarının kalsiyum salınımını hızlandırarak ısı direncini düşürmektedir. Bu nedenle süt endüstrisinde biyofilm ve spor oluşumunun engellenmesinde fosfat içerikli temizlik ajanları kullanılabilir [Kumar et al., 2019].

Tablo 2.1: Yaygın olarak kullanılan dezenfektanlardaki kimyasal ve fiziksel özelliklerin karşılaştırılması.

	Klor	İyodofor	Kuaterner Amonyum Bileşikleri	Asit Anyonik	Yağ Asidi	Perasetik Asit
Aşındırıcı	Evet	Hafif aşındırıcı	Hayır	Hafif aşındırıcı	Hafif aşındırıcı	Hafif aşındırıcı
Cildi tahriş edici	Evet	Hayır	Hayır	Hafif tahriş edici	Hafif tahriş edici	Hayır
Nötral pH'ta etkinlik	Evet	Tipe bağlı	Çoğu durumda	Hayır	Hayır	Evet
Asidik pH'ta etkinlik	Evet, ama stabil değil	Evet	Çoğu durumda	< 3.0-3.5	<3.5-4.0	Evet
Alkali pH'ta etkinlik	Nötral pH'tan daha az	Hayır	Çoğu durumda	Hayır	Hayır	Az etkili
Organik materyallerden etkilenme	Evet	Orta derecede	Orta derecede	Orta derecede	Kısmen	Kısmen
Suyun sertliğinden etkilenme	Hayır	Hafif	Evet	Hafif	Hafif	Hafif
Kalıcı antimikrobiyal aktivite	Yok	Orta	Evet	Evet	Evet	Yok
Maliyet	Düşük	Yüksek	Orta	Orta	Orta	Orta
Uyumsuzluklar	Asit solüsyonları, fenoller, aminler	Yüksek alkali deterjanlar	Anyonik ıslak ajanlar, sabunlar ve asitler	Katyonik sürfektanlar ve alkali deterjanlar	Katyonik sürfektanlar ve alkali deterjanlar	İndirgenen ajanlar, metal iyonları, güçlü alkaliler
Kullanılan solüsyonda kararlılığı	Hızlı dağılır	Yavaş dağılır	Kararlı	Kararlı	Kararlı	Yavaş dağılır
Yıkama yapılmadan FDA tarafından izin verilen en yüksek seviye	200 ppm	25 ppm	200 ppm	Çeşitli	Çeşitli	100-200 ppm
Su sıcaklığı hassasiyeti	Yok	Yüksek	Orta	Orta	Orta	Yok
Köpük seviyesi	Yok	Düşük	Orta	Düşük/Orta	Düşük	Yok
Fosfat	Yok	Yüksek	Yok	Yüksek	Orta	Yok
Zemin yükü toleransı	Yok	Düşük	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük

2.4.1. Süt Endüstrisinde Dezenfektan Kalıntıları ve Neden Olabileceği Sorunlar

Süt ve süt ürünlerine deterjanlar ve dezenfektanların bulaşma ve kalıntı miktarı, durulama işlemi yapılmadan önce alet ve ekipman yüzeyinde kalan temizleyici konsantrasyonu ve miktarına, kullanılan durulama suyunun miktarına, alet-ekipman yüzey yapısına, temizleyicinin durulanabilirliğine ve tesisat çıkışındaki akış yeterliliğine bağlı olmaktadır [Karagözlü ve Karagözlü, 2004]. Temizleyici kalıntılarının neden olabileceği sorunlar sağlık, duysal ve teknolojik olarak sıralanabilmektedir [Karagözlü ve Karagözlü, 2004].

Dezenfektan kalıntıları süt işletmesindeki başlangıç kültürlerin aktivitelerinin engellenmesine ve peynir, yoğurt gibi süt ürünleri fermantasyonunun engellenmesine sebep olabilmektedir [Karagözlü ve Karagözlü, 2004]. Klorlu dezenfektan bileşiklerinin süt ve süt ürünlerinde bulunması ve özellikle de anne sütlerine geçebilmelerinden dolayı bu bileşikler günümüzde dahi sağlık için tehdit oluşturmaktadır [Dervişoğlu ve ark., 2013]. Süte fenol esaslı dezenfektanların az miktarda karışması bile sütün tadının değişmesine neden olmaktadır [Karagözlü ve Karagözlü, 2004].

2.4.2. Biyoaktif Bileşiklerin Gıda Endüstrisinde Dezenfektan Olarak Kullanımı

Gıda işlemede mikrobiyal kontrolün temel amacı, zararlı mikroorganizmaların varlığının ve faaliyetlerinin yok edilmesi ve işleme ekipmanında biyolojik birikimin kontrol edilmesidir [Simões et al., 2010]. Gıda endüstrilerinde biyofilm ortadan kaldırma ve dezenfektan etkinliğini araştırma alanlarında birçok çalışma yapılmıştır [Simões et al., 2010]. Biyofilmlerin antibiyotiklere ve geleneksel dezenfeksiyon işlemlerine karşı direnç geliştirebildikleri için biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılmasında antibiyotiklerin veya dezenfektanların yüksek miktarda kullanımı oluşturabileceği yan etkiler açısından kullanışlı bulunmamaktadır [Wolfmeier et al., 2018; Simões et al., 2010]. Günümüzde geleneksel kontrol yöntemleri hala kullanılıyor olmasına rağmen, endüstriyel gıda güvenliğini sağlamak için doğal, daha ekonomik ve çevre dostu biyofilm kontrol yöntemleri vazgeçilmezdir [Srey et al.,

2013]. Doğal bileşikler çevre açısından güvenli olduğundan, kolay elde edilebilmektedir ve ekonomik olarak, zehirli kimyasallara potansiyel alternatifler olabilmektedir [Unlu et al., 2018].

Bitki özütleri içerisindeki biyoaktif maddelerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi ile patojenik bakterilere karşı kullanılabileceğinin kanıtlandığı birçok çalışma mevcuttur [Mishra et al., 2020; Lu et al., 2019; Kouidhi et al., 2015]. Örneğin, mandalina kabuklarından elde edilen özüt *Aspergillus niger*'e karşı [Abdel-Aziz et al., 2019], nar özütleri *Escherichia coli*'ye karşı [da Silva et al., 2019] ve yabanmersini ekstraktlarının *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibiyofilm etkileri gösterilmiştir. Doğal antibiyofilm bileşenlerinin çeşitli bakteri türlerinde biyofilm oluşumunu engellemesi veya ortadan kaldırmasının nedeni, bu bileşenlerin bakterileri yeterli çoğunluk algılama mekanizmasını engellemesi kaynaklı olduğu düşünülmektedir [Lu et al., 2019; Estrela et al., 2009].

Organik asitler, toksik kimyasal dezenfektanların tehlikelerini önlemek için gıda endüstrisinde güçlü antibiyofilm ajanları olarak kullanılabilmektedir [Akbas and Cag, 2016; Akbas and Ölmez, 2007]. Sitrik, malik ve gallik asit gibi organik asitler güvenli, kolay ve ucuz organik asitlerdir ve paslanmaz çelik veya polistiren gibi gıda ile temas eden yüzeyler için kimyasal dezenfektanlar olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır [Akbas and Cag, 2016]. Örneğin; 20 dakika süreyle sitrik asit [Akbaş and Şar, 2018; Akbas and Kokumer, 2015] ve malik asit uygulamalarının [Kökümer ve Akbaş, 2016] biyofilmlerin kontrolünde, gıda sanayinde uygulanan klor gibi çevre ve canlılar için toksik etkileri olan kimyasallara alternatif olabileceğini göstermektedir.

2.5. Doğal Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkiler tarih boyunca ilaç, gıda, kozmetik, tekstil gibi amaçlarla kullanılmış ve bitkilerden elde edilecek etkinin daha güçlü olması için aktif bileşenlerle zenginleştirilmiş özler elde etmenin yeni yollarını her zaman aranmaktadır [Vinatoru et al., 2017; Mason et al., 2011]. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri damıtma, çözücü ekstraksiyonu ve soğuk sıkıştırma olarak üç ana sınıfta ayrılmaktadır [Vinatoru et al., 2017]. Damıtma ve soğuk sıkıştırma genel olarak bitkiler içerisindeki yağın elde edilmesi için kullanılmaktadır [Vinatoru et al., 2017]. Çözücü ekstraksiyonu ise elde

edilmesi hedeflenen bileşik materyaline uygun amaçla seçilen çözücü ve yöntemin kullanılması ile gerçekleşmektedir [Vinatoru et al., 2017].

Ekstraksiyonda biyoyararlı maddeleri daha verimli şekilde elde edilmek ve çevre için zararlarını en aza indirmek için daha az çözücünün kullanıldığı veya hiç çözücünün kullanılmadığı modern teknoloji kullanılarak yeşil ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmektedir. Yeşil ekstraksiyonun ilkeleri Tablo 2.2’de verilmiştir [Chemat et al., 2012]. Mikrodalga destekli (MAE), ultrason destekli (UAE), darbeli elektrik alan destekli ve enzim destekli ekstraksiyonların yanı sıra basınçlı sıvı ve süper kritik sıvı ekstraksiyonları gibi gelişmiş yöntemlere günümüzde daha fazla önem verilmektedir [Panja, 2018]. Yeşil ekstraksiyon yöntemleri ile az veya hiç çözücü kullanımı, kısa ekstraksiyon süresi, güvenli ve çevreci olması ve daha fazla biyoaktif madde elde edilmesi nedeniyle modern ekstraksiyon yöntemleri klasik ekstraksiyon yöntemlerinden daha verimli görülmektedir [Panja, 2018; Chemat et al., 2017; Ivanovs and Blumberga, 2017; Veggi et al., 2012].

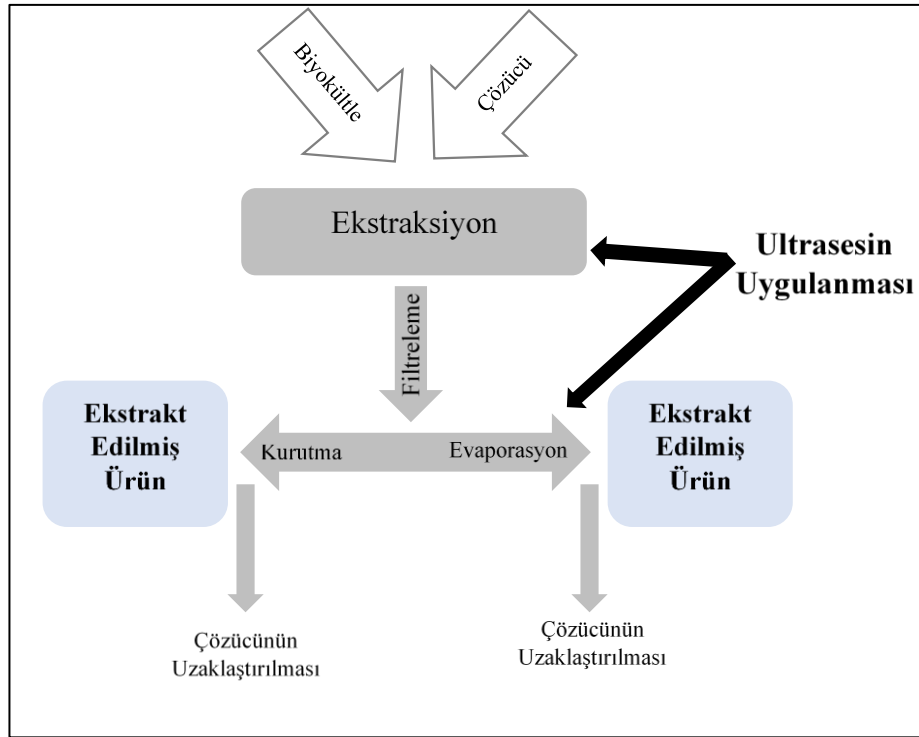
Tablo 2.2: Yeşil ekstraksiyon yöntemlerinin ilkeleri.

	İlke
1. İlke	Yenilenebilir bitki kaynaklarının kullanımı.
2. İlke	Alternatif çözücülerin ve esas olarak su veya zararsız çözücülerin kullanımı.
3. İlke	Enerji geri kazanımı ve yenilikçi teknolojiler kullanarak enerji tüketimini azaltılması.
4. İlke	Biyolojik ve tarımsal atıma endüstrisinden yararlanılarak atık yerine yan ürünlerin üretimi.
5. İlke	Güvenli, sağlam ve kontrollü süreçleri tercih edilmesi.
6. İlke	Kirletici içermeyen, bozulmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir ekstraktın belirlenmesi.

Günümüzde damıtma, çözücü ekstraksiyonu ve soğuk sıkıştırma gibi geleneksel yöntemler kullanılmaya devam edilmektedir, ancak UAE ve MAE yöntemleri klasik yöntemlere göre daha verimli olmaktadır [Vinatoru et al., 2017]. Doğal ekstraksiyon yöntemleri arasında UAE ve MAE yöntemleri daha fazla biyoaktif bileşik içeren ekstraktlar elde etmek için yıllar içerisinde geliştirilmiştir [Mason et al., 2011]. UAE

metodu ilk olarak 1950’li yıllarda laboratuvar deneyleri ile rapor edilmiş olup MAE metodu ise 1980’li yıllarda laboratuvar deneyleri ile rapor edilerek daha modern bir yöntem olarak kabul edilmektedir [Mason et al., 2011].

UAE, ses dalgalarının ultrases radyasyonu ileten cihazlar kullanılarak döngü şeklinde ortama yayılması sonucu ortamda basınç yaratılması ile gerçekleşmektedir [Dorosh et al., 2020]. UAE yönteminin uygulanması ekstraksiyon veya evaporasyon aşamalarında gerçekleştirilebilmektedir ve Şekil 2.3’de özetlenmiştir [Mason et al., 2011’den değiştirilerek uygulanmıştır]. UAE yönteminde uygulanan ultrases gücü hücre bütünlüğünü parçalayarak hücre içeriğinin açığa çıkmasını sağlar ve mekanik etki ile parça boyutunu azalarak bitki yüzeyinin ekstraksiyon çözücüsü ile temasını arttırmaktadır [Mason et al., 2011]. UAE yöntemi ile ekstraksiyonu yapılamayan veya düşük verimlere sahip olabilecek ekstraktların, ısıya duyarlı bileşenlerin ekstraksiyon verimi arttırılmaktadır [Tiwari, 2015].



Şekil 2.3: UAE yönteminin uygulanma aşamaları.

Mikrodalgalar, dalga boyları 1 mm ile 1 metre arasında değişen, frekansları 300 MHz (1 metre) ile 300 GHz (1 mm) arasında değişen elektromanyetik radyasyondur [Panja, 2018]. MAE ekstraksiyonunda ısı, mikrodalga ışınlarının etkisiyle ekstraksiyonu yapılacak maddeden ortama yayılırken, geleneksel ekstraksiyonda ısı

ortamdan ekstrakt edilecek maddenin içerisine doğru aktarılmaktadır. Bu, geleneksel ekstraksiyon ile MAE ekstraksiyonu arasındaki temel farkı oluşturmaktadır [Mason et al., 2011]. MAE ekstraksiyonunda mikrodalga'nın etki ettiği maddeler; elektron geçişine izin vermeyen ve ortamda kalmasını sağlayan metal gibi opak madde, mikrodalga'nın etki etmesi istenen asıl maddeye ulaşmasına aracılık eden geçirgen madde ve mikrodalga'nın etki etmesi beklenen emici madde olarak bilinmektedir [Vinatoru et al., 2017]. MAE yöntemi ile ekstraksiyon süresi, sıcaklık, çözücü tipi, çözücü konsantrasyonu, numune/çözücü oranı ve mikrodalga gücü uygun şartlarda ayarlanarak verimli ekstraksiyon yapılmaktadır [Panja, 2018].

MAE ve UAE yöntemlerinin uygulandığı ve bu yöntemlerin birbirleri ile kıyaslandığı birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin; Ince ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada melisa bitkisini MAE, UAE ve ısıtılıp yumuşama (maserasyon) yöntemleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı incelenmiş ve en yüksek fenolik madde miktarı sırasıyla MAE, UAE ve maserasyon yöntemlerinde bulunmuştur. Kaderides ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ise nar kabuklarının MAE ve UAE yöntemleri ile ekstraksiyonu sonrasında elde edilen toplam fenolik bileşik miktarı MAE ekstraktında UAE ekstraktından daha fazla olduğu belirlenmiştir. MAE yöntemi ile UAE yönteminden daha etkili ekstraksiyon verimi elde edilmesinin nedeni olarak MAE yönteminin UAE yönteminden daha fazla bitki hücrelerini parçaladığı/tahrip ettiği olarak görülmektedir [Aourach et al., 2021; Kaderides et al., 2019].

2.6. Kuşburnu

2.6.1. Kuşburnunun Özellikleri

Kuşburnu, yaklaşık 100 cins ve 3000 türden oluşan ve elma, erik, kiraz, çilek gibi çok sayıda meyveyi içeren Rosaceae familyasından *Rosa* cinsine ait çalı formunda bulunan ve kışın yaprağını döken bir bitki türü olup Batı Asya, Anadolu, Kuzey ve Orta Avrupa'da yetişmektedir. [Öz ve ark., 2018; Jung and Main, 2014]. Orman örtüsünde bolca bulunduğu bilinen kuşburnu türleri, odun dışı bitkisel orman ürünleri sınıfında yer almaktadır ve ülkemizde halk dilinde yabangülü, şillan, deligül,

g lburnu, g lelması, itburnu da denilen, yayılışı en fazla bulunan kuşburnu türü *Rosa canina* (L.)’dır [ z ve ark., 2018].

R. canina (L.) boyu 3.5 metre (m) y ksekl ge ulaşılabilen ve değişik şekilleri bulunan bir türdür. Dikenleri büyükçe geriye kıvrılmakta ve genişlemektedir. Yaprakları koyu yeşil renkli olup yaklaşık 6 tanedir ve yaprak şekilleri değişiklik göstermektedir.   ekler tekli veya 2-15 tanesi bir arada bulunmaktadır.   eklenme mayıs, haziran ve temmuz aylarında görülmektedir. Kuşburnu 30-2500 m rakımları arasında, orman açıklıklarında ve kayalık yamaçlarda yaygın olarak yetişmektedir. Ülkemizin birçok yerinde *R. canina* (L.) türü bulunmaktadır [ z ve ark., 2018].

Kuşburnu, farklı türdeki vitaminler ve fenolik asitler, tanenler ve flavonoidler gibi fitokimyasalların iyi bir kaynağıdır [Ayati et al., 2018]. Yapılan  alışmalar sonucunda kuşburnunun içerisinde; antosiyaninler, fenolik asitler, tanenler (hidrolize olabilen tanenler ve ellagitanninler), flavanoller, flavonoidler (rutin, kuersetin, isokuersetin, kemferol), karotenoidler, klorinler, organik asitler, şekerler (glukoz, fruktoz, sükroz, rafinoz, sorbitol ve trehaloz), yaę asitleri, galaktolipid, tokoferoller ve vitaminler (B9, C ve E vitaminleri) bulunduğu gösterilmiştir [Ayati et al., 2018; Cunja et al., 2016]. Tüm kuşburnu türlerindeki temel yaę asidi α -linolenik asittir ve bunu palmitik ve linoleik asitler takip etmektedir [Ayati et al., 2018; Ercisli, 2007]. C vitamini yönünden oldukça zengin olan kuşburnu N, P, K, Ca, Mg ve Zn gibi çeşitli mineraller içermektedir [Cunja et al., 2016]. Kuşburnu meyvesinde bulunan askorbik asit ve karetonoidler ve çekirdeklerinde bulunan E vitamini sayesinde iyi bir antioksidandır. Bu nedenle C ve E vitaminlerinin eksikliği gibi durumlarda tıbbi ve hastalık  nleme amaçlı bir takviye olarak önerilmektedir [Dubtsova et al., 2012]. Taze kuşburnu, kurutulmuş kuşburnundan daha fazla toplam fenolik bileşik içermesine rağmen, kurutulmuş kuşburnu da önemli antioksidan aktivite gösteren biyoaktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır [Paunović et al., 2019].

2.6.2. Kuşburnunun  lkemizde ve Dünyada Kullanımı

Bazı kültürlerde kuşburnu gıda olarak kullanılırken, bazılarında ilaç olarak kullanılmaktadır [Ayati et al., 2018; Patel, 2017]. Geleneksel Avrupa halk tıbbında kuşburnu m şhil, idrar söktürücü, gut karşıtı ve romatizma önleyici ilaç olarak kullanılmıştır [Gürbüz ve ark., 2003]. İşve  ve Alman mutfağında çorba olarak [Patel, 2017], Romanya’da A ve C vitamin takviyesi olarak [Oprica et al., 2015],  in’de

kuşburnu yaprakları yanık ve çeşitli hastalıkların tedavisinde [Fenglin et al., 2004] kullanılmaktadır. Kuşburnu cildin nemini ve elastikiyetini arttırdığı [Phetcharat et al., 2015] için krem ve sabun gibi birçok kozmetik üründe de kullanılmaktadır [Ayati et al., 2018].

Türkiye’de ise kuşburnu önemli bir bitkisel ilaçtır [Nur, 2010]. Yaprakları suda kaynatılarak soğuk algınlığı, grip, öksürük, tedavi edici ve idrar söktürücü etkisiyle kullanılmaktadır [Polat and Satil, 2012; Coruh and Ercisli, 2010]. Ayrıca Türkiye’de atıştırmalıklarda [Gürbüz et al., 2003], marmelat ve meyve suyu yapımında [Güneş, 2010] da kuşburnu kullanılmaktadır.

Kuşburnunun geleneksel kullanımları yaygın olmakla birlikte ayrıca kuşburnuyla ilgili çeşitli bilimsel çalışmalar da yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kuşburnunun; karaciğer üzerinde koruyucu etki [Sadeghi et al., 2016], böbrek taşına karşı koruyucu etki [Tayefi-Nasrabadi et al., 2012], anti-demans etki [Daneshmand et al., 2016], kalp hastalıkları riskini azaltıcı etki [Cavalera et al., 2017], antiobezite etki [Nagatomo et al., 2015], antioksidant ve α -amilaz üzerinde inhibitör etkisinden dolayı antidiyabetik etki [Jemaa et al., 2017], eklem ve kaslarda iltihap giderici [Willich et al., 2010] ve ağrı kesici etki [Chrubasik-Hausmann et al., 2014], kanser karşıtı etki [Ersoy et al., 2015] gösterdiği belirlenmiştir. Çeşitli kanser hücre hatları ile yapılan bir başka çalışmada, kuşburnu ekstraktlarının tümör hücre hatlarının büyümesini engellediği fakat sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisi olmadığı gözlemlenmiştir [Daels-Rakotoarison et al., 2002]. Kuşburnu çekirdeklerinin biyogaz üretimi için kullanılma potansiyeli taşıdığı da belirlenmiştir [Črnivec et al., 2014].

Kuşburnunun yapılan çalışmalarla mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu da görülmüştür. Kuşburnu *Helicobacter pylori* üzerinde antimikrobiyal etki [Horváth et al., 2012] göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarıyla yapılan çalışmada kuşburnu yapraklarının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin olduğu belirlenmiştir [Živković et al., 2016]. *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baylyi* ve *P. aeruginosa* bakterileri ile yapılan bir başka çalışmada ise kuşburnu ekstraktlarının hastalığa sebep olan bu bakterilerin büyümesini engelleme potansiyeli gösterdiği ve kuşburnunun ilaçlarla birlikte kullanımıyla ilaçların etkinliğini arttırabileceği, aynı zamanda da yan etkiyi azaltıp ilaca dirençli patojenlerin gelişimini azaltabileceği düşünülmektedir [Wang et al., 2020].

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan agar, Tryptic Soy Broth (TSB) Biolife (Milano, İtalya); maya özütü ve D (+) laktoz-1-hidrat PanReac AppliChem (Barselona, İspanya); metanol (MeOH) Sigma Aldrich (Darmstadt, Almanya) ve etanol (EtOH) ise Alkomed (Plovdiv, Bulgaristan) markalarından temin edildi. Biyofilm oluşumu ve biyofilmin inhibisyonu deneylerinde yüzey olarak kullanılan 6 kuyulu hücre kültürü plakaları ve 96 kuyulu mikrotitrasyon plakası TPP (Darmstadt, Almanya)'den sağlandı.

HPLC cihazında kullanılan etanol, metanol, asetonitril (HPLC Grade), hidroklorik asit (HCl), gentamisin sülfat, fruktoz, glukoz, potasyum dihidrojen fosfat Merck (Darmstadt, Almanya)'ten temin edildi. Biyofilm deneylerinde kullanılan kristal viyole Merck (Darmstadt, Almanya)'dan; sodyum hipoklorit ACE (İstanbul, Türkiye)'den satın alındı 0.45 µm gözenek çaplı filtreler Isolab (Bavyera, Almanya)'tan sağlandı. Kurutulmuş kuşburnu yerel bir satıcıdan (İstanbul, Türkiye); yağsız süt tozu Bağdat Baharat (Ankara, Türkiye)'tan satın alındı.

HPLC ile şeker (glukoz, fruktoz) analizleri için GL Sciences (Tokyo, Japonya) marka NH2 kolon (Inertsil, 4.5 I.D.x250 mm) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında, çekirdeklerinden ayrılmış ve kurutulmuş kuşburnu meyvesini toz haline getirmek için mutfak tipi bir öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Düzce, Türkiye) kullanıldı. Ekstraksiyon bir mikrodalga (Arçelik MD-524S, İstanbul, Türkiye) ve su banyosunda (Isolab, Ultrasonic Cleaner 621.05.001, Bavyera, Almanya), katı madde ayrımı ise santrifüj cihazı (Gyrozen 1248R, Daejeon, Kore) ile yapıldı. Ekstraktlardaki çözücü ve fazla miktardaki suyun uzaklaştırılması ise bir döner buharlaştırıcı cihazı (Heidolph Hei-VAP, Bavyera, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi.

Toz halinde bulunan kuşburnu ve besiyeri içeriklerinin tartımında hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya), besiyerlerinin ve ekstraktların pH ölçümleri için ise pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) kullanıldı. Ekstraktların şeker analizi Refraktif İndeks (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japonya) dedektörünü içeren bir HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile yapıldı.

Besiyeri hazırlama aşamasında bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA RH basic 2, Deutschland, Almanya) kullanıldı. Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Innova 42, Hamburg, Almanya) kullanılarak bakteri hücrelerinin uygun koşullarda inkübasyonu sağlandı. Gelişen bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunu ve ekstraktların toplam fenolik miktarlarını belirlemede spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1280, Duisburg, Almanya) kullanıldı. Bulunduğu kap içerisinde dip kısma çöken bakterilerin besiyeri içinde eşit olarak yayılması ve ekstraktların kullanım öncesinde eşit olarak dağılması için bir hızlı karıştırıcı (IKA Vortex Genius 3, Deutschland, Almanya) kullanıldı. Biyofilm oluşumu aşamasında kültür gelişimi için inkübatör olarak bir etüv (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Langenselbold, Almanya), biyofilm oluşumunun 570 nm'deki absorbans değerini ölçmek için bir ELISA okuyucu (BMG LABTECH FLUOstar Omega, Offenburg, Almanya) kullanıldı. Tüm deney malzemelerinin temizliği deneyden önce bir otoklav cihazı (Nüve, OT 90L, Akyurt, Ankara, Türkiye) yardımıyla yapıldı.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu tez çalışmasında, GTÜ Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı bünyesinde bulunan *Paenibacillus sp.* 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y bakteri suşları kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Sterilizasyonu

Kullanılan besiyerleri 121 °C’de, 20 dakika boyunca otoklav cihazında (Nüve, OT 90L, Akyurt, Ankara) steril edildi ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra kullanılacağı zamana kadar +4 °C sıcaklıkta saklandı. İçerisinde şeker barındıran besiyerlerinin şeker içeriği besiyerinden ayrı olarak otoklavlandı. Kullanılacağı zaman besiyeri ve şeker içeriği steril koşullar altında bir araya getirildi. İçerisinde agar bulunduran besiyerleri ise 17 mL hacimde steril koşullar altında Petri kaplarına aktarıldı. Besiyerlerinin katılaşması tamamlandıktan sonra kullanılacağı zamana kadar +4 °C sıcaklıkta saklandı.

3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Saklanması

Bakteri suşları (*Paenibacillus* sp. 32O-W, *P. naphthalenovorans* 32O-Y) steril triptik soya katı besiyeri (TSA) (15 g/L agar içeren) üzerine öze yardımıyla çizgi ekim yöntemi kullanılarak ekimleri yapıldı. Bakteri kültürü içeren Petriler bir gece boyunca 45 °C sıcaklıkta bir etüvde (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Langenselbold, Almanya) inkübe edildi. Taze kültürler +4 °C sıcaklıkta saklandı ve haftalık olarak alt kültürleme işlemine tabi tutuldu.

3.2.3. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Sıvı bakteri kültürleri (*Paenibacillus* sp. 32O-W, *P. naphthalenovorans* 32O-Y) TSB besiyerlerinin kullanılmasıyla hazırlandı. 10 mL besiyeri 50 mL hacimli erlen içerisine eklendi. Yapılan taze alt kültürleme işlemi yapılmış bakteri kültürleri öze yardımı ile alındı ve 10 mL besiyeri bulunduran 50 mL hacimdeki erlen içerisine ekildi. Hazırlanan kültürler 45 °C sıcaklıkta 170 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde (New Brunswick Innova 42, Hamburg, Almanya) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin optik yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0.6’yı aşmayacak şekilde spektrofotometre cihazında ölçüldü.

3.2.4. Kuşburnu Meyvesinin Ekstraksiyonu

3.2.4.1. Kuşburnunun Ekstraksiyon İçin Hazırlanması

Yerel bir satıcıdan temin edilen kurutulmuş kuşburnunun çekirdek ve iç tozu el yordamı ile temizlendi. İşlem sonunda elde edilen kurutulmuş kuşburnu meyvesi öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Düzce, Türkiye) yardımıyla toz haline getirildi ve kullanım süresine kadar +4 °C’de saklandı.

3.2.4.2. Kuşburnu Ekstraktlarının Hazırlanması

MAE (mikrodalga aracılı ekstraksiyon) yöntemiyle kuşburnu meyvesinin ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla distile su (Dsu); (E1-M) ve % 50 etanol (EtOH); (E2-M) ve % 50 metanol (MeOH); (E3-M) ile ekstraktlar hazırlandı [Tablo 3.1]. Elde edilen ekstraktlar farklı oranlarda ultra saf su ile seyreltildi (1/1, 1/2, 1/4).

UAE (ultrasese aracılı ekstraksiyon) yöntemiyle kuşburnu meyvesinin ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla distile su (Dsu); (E1-U), % 50 etanol (EtOH); (E2-U) ve %50 metanol (MeOH); (E3-U) ile ekstraktlar hazırlandı [Tablo 3.1]. Elde edilen ekstraktlar farklı oranlarda saf su ile seyreltildi (1/1, 1/2, 1/4).

E1-M, E2-M ve E3-M ekstraktları 10 g kurutulmuş kuşburnu tozunu sırasıyla 100’er mL Dsu, % 50 (v/v) etanol ve % 50 (v/v) metanol çözeltileri ile 500 mL hacminde cam şişe içerisinde karıştırılarak hazırlandı [Rovná et al., 2015’den değiştirilerek uygulanmıştır]. Elde edilen ekstraksiyon karışımları 3 dakika boyunca 120 W güçteki mikrodalgaya maruz bırakıldı ve bu işlem iki kez tekrar edildi [Martino et al., 2008’den değiştirilerek uygulandı]. Mikrodalga uygulamasının ardından karışım, +4 °C sıcaklıkta, 4000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst faz 250 mL hacmindeki cam balona aktarıldı ve bir döner buharlaştırıcı cihazı (Heidolph Hei-VAP, Bavyera, Almanya) yardımıyla evaporasyona tabi tutuldu.

E1-U, E2-U ve E3-U ekstraktları 10 g kurutulmuş kuşburnu tozunu sırasıyla 100’er mL Dsu, % 50 (v/v) etanol ve % 50 (v/v) metanol çözeltileri ile 500 mL hacminde cam şişe içerisinde karıştırılarak hazırlandı [Rovná et al., 2015’den değiştirilerek uygulanmıştır]. Elde edilen ekstraksiyon karışımları 2 saat boyunca 80 °C sıcaklıktaki su banyosunda tutuldu [Szentmihályi et al., 2002’den değiştirilerek

uygulandı]. Ultrases uygulamasının ardından karışım, +4 °C sıcaklıkta, 4000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst sıvı 250 mL hacmindeki cam balona aktarıldı ve bir döner buharlaştırıcı cihazı (Heidolph Hei-VAP, Bavyera, Almanya) yardımıyla evaporasyona tabi tutuldu.

Tablo 3.1: MAE ve UAE yöntemleri ile kuşburnu ekstraktlarının hazırlığında kullanılan çözücü oranları ve ekstraksiyon süreleri.

Ekstrakt	Çözücü	Çözücü Oranı (v/v)	Güç (W)	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)-Tekrar Sayısı	Kaynak
E1-M	Dsu	100	120 W	-	3 dakika-2 tekrar	Martino et al., 2008'den değiştirilerek uygulanmıştır.
E2-M	EtOH:Dsu	50:50	120 W	-	3 dakika-2 tekrar	Martino et al., 2008'den değiştirilerek uygulanmıştır.
E3-M	MeOH:Dsu	50:50	120 W	-	3 dakika-2 tekrar	Martino et al., 2008'den değiştirilerek uygulanmıştır.
E1-U	Dsu	100	-	80 ° C	2 saat	Szentmihályi et al., 2002'den değiştirilerek uygulanmıştır.
E2-U	EtOH:Dsu	50:50	-	80 ° C	2 saat	Szentmihályi et al., 2002'den değiştirilerek uygulanmıştır.
E3-U	MeOH:Dsu	50:50	-	80 ° C	2 saat	Szentmihályi et al., 2002'den değiştirilerek uygulanmıştır.

3.2.5. Kuşburnu Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Deneyleri Öncesi Hazırlanması

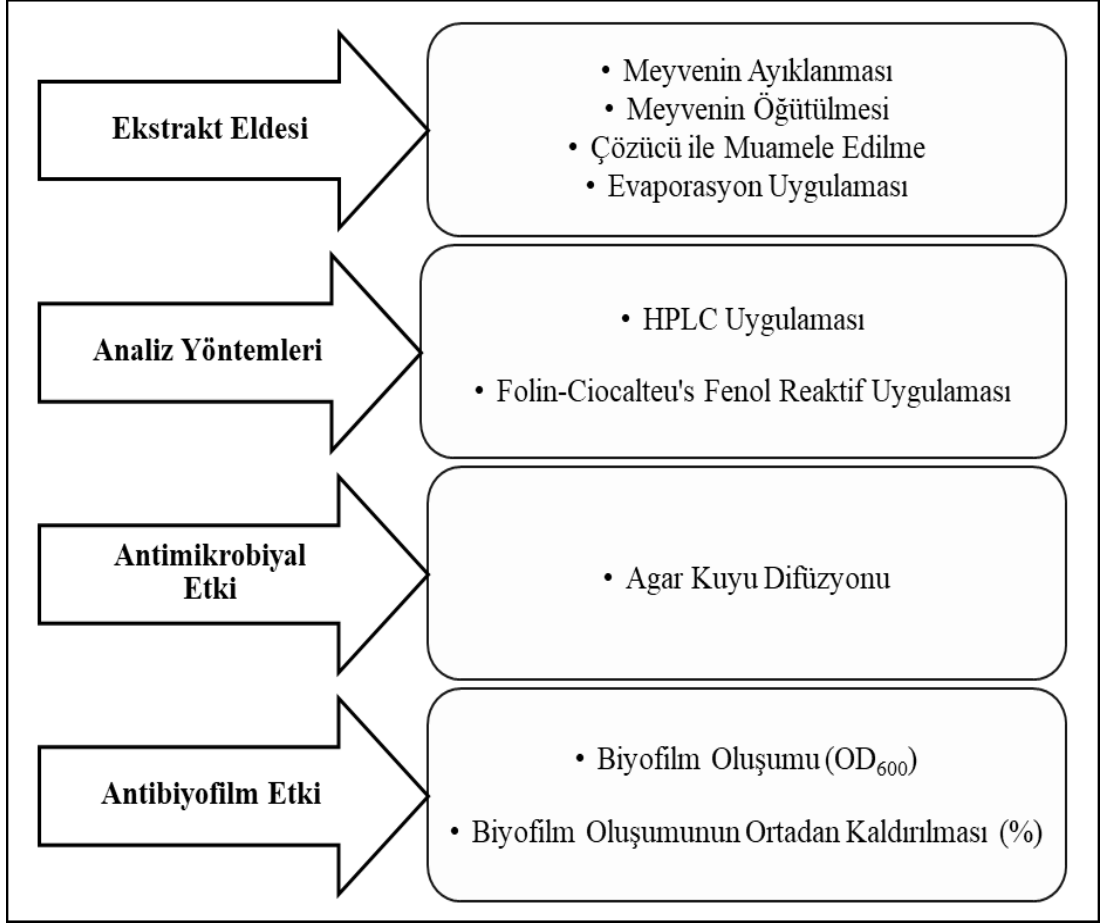
Elde edilen ekstraktlar (E1-M, E2-M, E3-M, E1-U, E2-U, E3-U), 4 °C sıcaklıkta 4000 rpm hızda 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst sıvı 0.45 µm gözenek çaplı filtre kullanılarak süzüldü. E1-M, E2-M, E3-M, E1-U, E2-U ve E3-U ekstraktlarının son hacmi 25 mL'ye tamamlandı ve böylece her ekstraktın konsantrasyonu eşitlenerek ekstraksiyon verimi % 25 olarak ayarlandı [Kilic et al., 2016]. Bu işlemin ardından ekstraktlar -18 °C sıcaklıkta ışık görmeyecek şekilde saklandı [Alkass et al., 2013]. Kullanılacağı zaman -18 °C sıcaklıkta saklanan donmuş ekstraktlar çözündürüldükten sonra ekstraktların eşit şekilde dağılması için hızlı karıştırıcıda (IKA Vortex Genius 3, Deutschland, Almanya) 2500 rpm'de birkaç saniye çalkalandı.

Hazırlanan kuşburnu ekstraktları seyreltme oranları 1/1, 1/2, 1/4 olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı [Tablo 3.2].

Tablo 3.2: MAE ve UAE yöntemleriyle hazırlanan ekstraktların kullanılan çözücü ve seyreltme oranlarına göre isimlendirilmesi (MAE: Mikrodalga Aracılı Ekstraksiyon, UAE: Ultrases Aracılı Ekstraksiyon, Dsu: Distile Su, EtOH: Etanol, MeOH: Metanol).

Ekstraksiyon Yöntemi	Ekstraksiyon Çözeltileri	Seyreltme Oranları		
		1/1	1/2	1/4
MAE	Dsu	E1-M1	E1-M2	E1-M4
	Dsu:EtOH	E2-M1	E2-M2	E2-M4
	Dsu:MeOH	E3-M1	E3-M2	E3-M4
UAE	Dsu	E1-U1	E1-U2	E1-U4
	Dsu:EtOH	E2-U1	E2-U2	E2-U4
	Dsu:MeOH	E3-U1	E3-U2	E3-U4

Kurutulmuş kuşburnu ekstraktlarının elde edilmesi, ekstraktlarda bulunabilecek biyoaktif bileşiklerin analizi ve ekstraktların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi için izlenen adımlar Şekil 3.1'de gösterildi.



Şekil 3.1: Ekstraktların elde edilmesi, ekstraktlardaki bileşenlerin analiz yöntemleri, ekstraktların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi aşamaları.

3.2.6. Kuşburnu Ekstraktlarının pH Analizi

Evaporasyon sonrası elde edilen ekstraktların pH'sının ölçülmesi amacıyla pH metre [Hanna Instruments., Üretici yöntemi] yöntemi uygulandı.

Ekstraktların pH ölçümü için pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) cihazı kullanıldı. Ekstraktların sıcaklığı 45 °C'ye ayarlandı. İçerisinde ekstrakt bulunan cam beher içerisine pH elektrodu ve sıcaklık probu yaklaşık 3 cm derinliğinde daldırıldı ve hafifçe karıştırıldı. Elektrodun sabit olması sağlandı. Farklı ekstrakt ölçümleri sırasında çapraz kontaminasyonu önlemek için elektrot distile su ile yıkandı ve kurulandı.

3.2.7. Kuşburnu Ekstraktlarında Bulunan Şeker Bileşenlerinin Analizi

Evaporasyon sonrası elde edilen ekstraktlardaki şeker içeriklerinin belirlenmesi amacıyla HPLC [GL Sciences Inc., Üretici yöntemi] yöntemi uygulandı.

Ekstratların şeker içeriği, HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazı kullanılarak belirlendi. Ekstraktlar içindeki şekerlerin tespiti için kırılma indisi detektörü (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile NH₂ kolonu (Inertsil, 5 µm, 4.6x250 mm, GL Sciences Inc.) kullanıldı. Glukoz ve fruktoz çözeltileri standartları (5, 10, 20, 40 ve 50 mg / mL) ve ekstraktlar 3 µL hacim olacak şekilde enjekte edildi. Kolon 25 °C sıcaklığa ayarlandı. Mobil faz olarak 75:25 (v / v) asetonitril solüsyonu kullanılarak akış hızı 1 mL / dakikaya ayarlandı (GL Sciences Inc., Üretici yöntemi).

3.2.8. Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

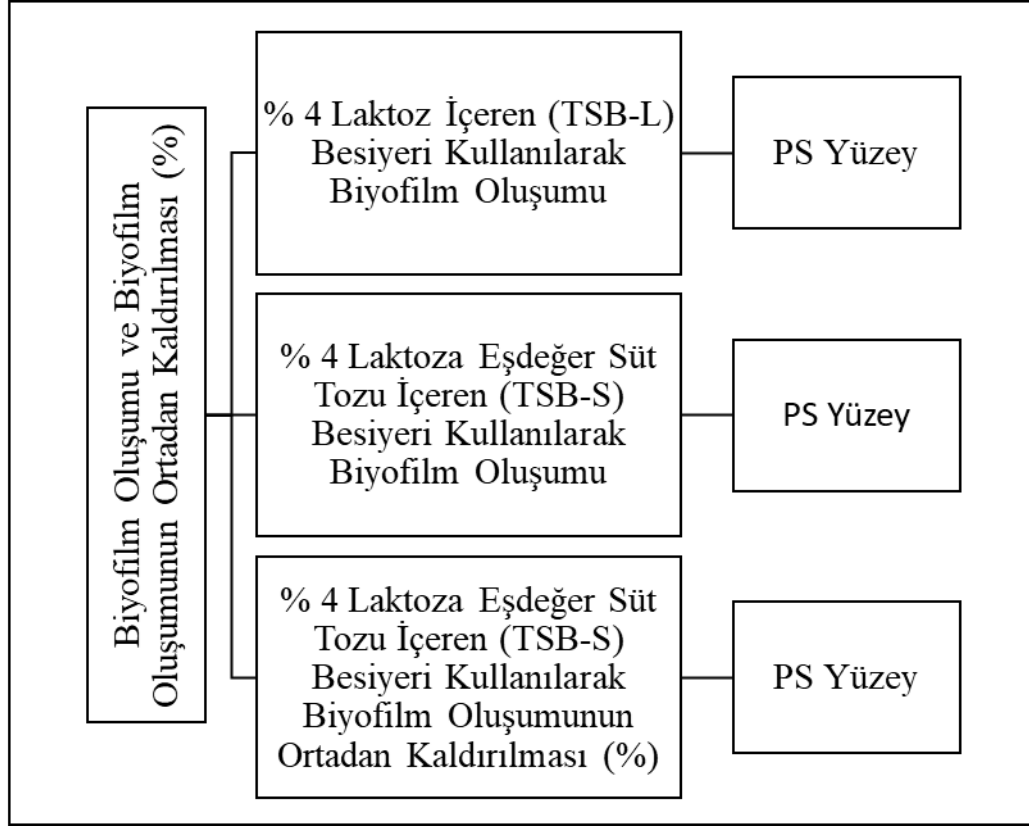
Paenibacillus sp. 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y suşlarını içeren hücre kültürleri, fizyolojik tuzlu su (% 0.9 NaCl, FTS) ile 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı [Kökümer, 2013].

600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu 0.5 absorbans değerinde bulunan bakteri süspansiyonları hızlı karıştırıcıda (IKA Vortex Genius 3, Deutschland, Almanya) 500 rpm hızında 3 saniye boyunca karıştırılarak besiyerinde eşit dağılması sağlandıktan sonra 100 µL hacimde steril Luria-Bertani katı besiyeri (LB-A) (15 g/L agar) üzerine yayılarak ekildi. Kültürün besiyeri üzerinde kuruması için 10 dakika beklendi. Agar üzerine aseptik koşullar altında 7 mm çaplı kuyular açıldı. Açılan kuyulara farklı oranlarda seyreltilmiş farklı ekstraktlar [Tablo 3.2] ve kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotiği (10 µg/mL) [Pushparaj Selvadoss et al., 2018] eklendi. Ekstraktların antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiğinin antimikrobiyal etkisi ile karşılaştırıldı [Pushparaj Selvadoss et al., 2018].

3.2.9. Farklı Besiyerileri Varlığında Oluşumu

Termofilik bakteri biyofilmlerinin oluşumu % 4 laktoz içeren TSB Besiyeri (TSB-L) [Assaf et al., 2014] ve % 4 laktoza eşdeğer süt tozu içeren TSB besiyeri (TSB-

S) [Assaf et al., 2014’den değiştirilerek uygulanmıştır] besiyeri kullanıldı. Biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılacağı (%) gözlemleneceği besiyeri ve yüzey Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Kuşburnu ekstraktlarının *Paenibacillus sp.* 32O-W, *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y suşları üzerindeki antibiyofilm etkilerinin incelenmesinde uygulanan aşamalar (PS: polistren yüzey).

3.2.8.1. Laktoz Varlığında Biyofilm Oluşumu

Paenibacillus sp. 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y suşlarını içeren ön kültürler kullanılarak TSB-L besiyeri ile 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) olacak şekilde seyreltilerek hücre kültürleri hazırlandı.

TSB-L besiyeri ile biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi için; kuyu hacmi 0.3 mL olan 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında 0.2 mL hacimde hücre kültürü eklendi ve 45 °C sıcaklıkta 24 ve 72 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücre kültürü içeren mikrotitrasyon plakaları nazikçe boşaltıldı ve biyofilm oluşturmeyan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla distile

su ile 3 kez nazikçe yıkandı. Yüzeyler ters çevrilerek yüzey üzerindeki suyun uzaklaştırılması ve kuruması sağlandı.

Yüzeye tutunan hücreleri tespit etmek için mikrotitrasyon plağının her bir kuyusuna 0.25 mL hacimde % 0.5 (w/v) kristal viyole çözeltisi [Lee et al., 2015] eklendi. Yüzeylerin 20 dakika boyunca oda sıcaklığında boya ile muamelesi gerçekleştirildi. Süre sonunda kristal viyole boyası içeren kuyular distile su kullanılarak 3 kez nazikçe yıkandı ve oda sıcaklığında yüzeydeki suyun süzülmesi beklendi. Daha sonra, her bir kuyuya (95:5) etanol:asetik asit çözeltisinden 0.2 mL eklendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler temiz mikrotitrasyon plakalarına aktarıldı ve örneklerin optik yoğunlukları 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutuldu [Bakkiyaraj et al., 2013].

3.2.8.2. Süt Tozu Varlığında Biyofilm Oluşumu

Paenibacillus sp. 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y suşlarını içeren ön kültürler kullanılarak TSB-S besiyeri ile 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) olacak şekilde seyreltilerek hücre kültürleri hazırlandı.

TSB-S besiyeri ile biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi için; kuyu hacmi 15 mL olan 6 kuyulu hücre kültürü plakasına 10 mL hacimde hücre kültürü eklendi ve 45 °C sıcaklıkta 24 ve 72 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücre kültürü içeren plakalar nazikçe boşaltıldı ve biyofilm oluşturmayan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla distile su ile 3 kez nazikçe yıkandı. Yüzeyler ters çevrilerek yüzey üzerindeki suyun uzaklaştırılması ve kuruması sağlandı.

Yüzeye tutunan hücreleri tespit etmek için mikrotitrasyon plağının her bir kuyusuna 10 mL hacimde % 0.5 (w/v) kristal viyole çözeltisi [Lee et al., 2015] eklendi. Yüzeylerin 20 dakika boyunca oda sıcaklığında boya ile muamelesi gerçekleştirildi. Süre sonunda kristal viyole boyası içeren kuyular distile su kullanılarak 3 kez nazikçe yıkandı ve oda sıcaklığında yüzeydeki suyun süzülmesi beklendi. Daha sonra, her bir kuyuya (95:5) etanol:asetik asit çözeltisinden 10 mL eklendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler temiz mikrotitrasyon plakalarına aktarıldı ve örneklerin optik yoğunlukları 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutuldu [Bakkiyaraj et al., 2013].

TSB-L ve TSB-S besiyerinde biyofilm oluşumu, biyofilm oluşumunun ortalama absorbans değerinden bakteri kültürü içermeyen besiyerinin absorbans değerinin çıkarılması ile belirlenmiştir [Pitts et al., 2003].

$$\text{Biyofilm oluşumu (OD}_{570} \text{ absorbans değeri)} = [\mathbf{BF} - \mathbf{B}] \quad (3.1)$$

Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde ise Stepanovic et al., (2007) çalışması referans alınmıştır;

$$OD (BF) \leq OD (B): \text{biyofilm oluşumu yok;} \quad (3.2)$$

$$OD (B) \leq OD (BF) \leq 2xOD (B): \text{zayıf biyofilm oluşumu;} \quad (3.3)$$

$$2xOD (B) \leq OD (BF) \leq 4xOD (B): \text{orta düzey biyofilm oluşumu;} \quad (3.4)$$

$$4xOD (B) \leq OD (BF): \text{kuvvetli biyofilm oluşumu} \quad (3.5)$$

BF, biyofilm oluşumunun ortalama absorbans değeri (pozitif kontrol); B, bakteri kültürü içermeyen besiyeri.

3.2.10. TSB-S Besiyerinde Biyofilm Oluşumunun Ortadan Kaldırılması (%)

TSB-S besiyeri kullanılarak *Paenibacillus* sp. 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y bakterilerinin biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması deneyi gerçekleştirildi [Albayrak, 2018'den değiştirilerek uygulanmıştır].

Paenibacillus sp. 32O-W ve *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y bakterilerini içeren ön kültürler kullanılarak TSB-S besiyeri ile 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) olacak şekilde seyreltilerek hücre kültürleri hazırlandı. Biyofilmin ortadan kaldırılmasında antimikrobiyal etkisi gentamisin (10 µg/mL) antibiyotiğine eş değer etkinlikte bulunan 1/2 oranında seyreltilen E2-M ekstraktı (E2-M2 ekstraktı) kullanıldı. Kontrol olarak kullanılan klor (K) gıda endüstrisinde temizlik amacıyla kullanıldığı konsantrasyonda (200 ppm) hazırlandı.

24 ve 72 saat inkübasyon sonunda hücre kültürü içeren plakalar nazikçe boşaltıldı ve biyofilm oluşturmayan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla distile su ile 3 kez nazikçe yıkandı. Mikrotitrasyon plağı ters çevrilerek yüzey üzerindeki suyun süzülmesi sağlandı.

Her bir kuyuya 10 mL hacimde E2-M2 ekstraktı ile kontrol olarak kullanılan K (200 ppm) solüsyonu belirlenen kuyulara ayrı olacak şekilde ilave edildi. E2-M2

ekstraktı ve K solüsyonu 5 dakika boyunca kuyularda tutuldu. Süre sonunda ekstrakt ve K solüsyonu bulunan kuyular 6 kere distile su ile nazikçe yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu.

Biyofilm tabakasını belirleyebilmek amacıyla her bir kuyuya 10 mL hacimde % 0.5 (w/v) kristal viyole çözeltisi [Lee et al., 2015] eklendi. Biyofilm içeren kuyular 20 dakika boyunca oda sıcaklığında % 0.5 (w/v) kristal viyole çözeltisi ile muamele edildi. Süre sonunda kristal viyole boyası içeren kuyular distile su kullanılarak 3 kez nazikçe yıkandı ve oda sıcaklığında yüzeydeki suyun süzülmesi beklendi. İşlem bitince her kuyuya etanol:asetik asit (95:5) çözeltisi 10 mL eklendi ve 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyudan 100 µL örnek alındı ve 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasına ELISA okuyucuda 570 nm dalgaboyunda okutulmak üzere aktarıldı. [Bakkiyaraj et al., 2013]

Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılma oranları (%) tüm uygulamalar için biyofilm oluşumuyla kıyaslanarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı [Mohsenipour and Hassanshahian, 2015'den değiştirilerek uygulanmıştır].

Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılma oranları (%)

Ekstrakt uygulaması yapılan örneklerde;

$$\text{Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması (\%)} = \left[\left(\frac{(BF-B)-(EU-BE)}{BF-B} \right) * 100 \right] \quad (3.6)$$

Klor uygulaması yapılan örneklerde;

$$\text{Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması (\%)} = \left[\left(\frac{(BF-B)-(KU-BK)}{BF-B} \right) * 100 \right] \quad (3.7)$$

BF, biyofilm oluşumunun ortalama absorbans değeri (pozitif kontrol); B, bakteri kültürü içermeyen besiyeri; EU, inkübasyon sonrası ekstrakt uygulaması sonucu oluşan ortalama absorbans değeri; BE, bakteri kültürü içermeyen besiyerinin inkübasyon sonrası ekstrakt ile muamelesi sonucu oluşan ortalama absorbans değeri; KU, klor uygulaması sonucu oluşan ortalama absorbans değeri (negatif kontrol); BK, bakteri kültürü içermeyen besiyerinin inkübasyon sonrası klor solüsyonu ile muamelesi sonucu oluşan ortalama absorbans değeri.

3.2. İstatiksel Analiz

Bu tez çalışmasında tüm deneyler en az üç kez tekrar edildi. İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2016 programı ile belirlendi. p değerleri, tek kuyruklu t-testi ile kuşburnu ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiği ile, biyofilm oluşumunun ortadan kaldırma etkinliği ise klor solüsyonu uygulaması ile karşılaştırılarak belirlendi.

4.BULGULAR

4.1. Farklı Kuşburnu Ekstraktlarında Bulunan Şeker Miktarlarının Belirlenmesi

Farklı çözücüler ile hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının içerdiği şeker miktarları HPLC yöntemi ile belirlendi.

Farklı çözücüler ve farklı yöntemler ile hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının içerisinde bulunan şeker türü ve miktarı HPLC cihazı kullanılarak ve glukoz ve fruktoz standartları ile karşılaştırılarak belirlendi. Analiz her bir ekstrakt için en az üç kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı. Değerlendirmede MAE ve UAE yöntemi ile hazırlanan kuşburnu ekstraktlarındaki şeker miktarlarının birbirlerinden farklılık gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$).

MAE yöntemi ile hazırlanan E1-M ekstraktında glukoz % 0.96 w/v olarak ölçülürken fruktoz % 1.34 w/v olarak ölçüldü. E2-M ekstraktında glukoz % 3.9 w/v ölçülürken fruktoz % 5.7 w/v olarak ölçüldü. E3-M ekstraktında ise glukoz % 4.42 w/v ölçülürken fruktoz ise % 5.34 w/v olarak ölçüldü [Tablo 4.1].

UAE yöntemi ile hazırlanan E1-U ekstraktında glukoz % 0.2 w/v olarak ölçülürken fruktoz ise % 0.1 w/v olarak ölçüldü. E2-U ekstraktında glukoz % 4.1 w/v olarak ölçülürken fruktoz % 5.2 w/v olarak ölçüldü. E3-U ekstraktında glukoz % 2.84 w/v ölçülürken fruktoz ise % 3.56 w/v olarak ölçüldü [Tablo 4.1].

İki farklı yöntem ile hazırlanan ekstraktlarda, UAE yöntemi kullanılan E1-U ekstraktı haricindeki diğer tüm ekstraktlarda fruktoz miktarının glukoz miktarından daha fazla olduğu belirlendi. MAE yöntemi ile hazırlanan ekstraktlardaki toplam şeker (glukoz + fruktoz) miktarının UAE yöntemi ile hazırlanan ekstraktlardaki toplam şeker (glukoz + fruktoz) miktarından daha fazla olduğu gözlemlendi [Tablo 4.1].

Tablo 4.1: Farklı çözücü ve yöntemlerle hazırlanan kuşburnu ekstraktlarındaki glukoz ve fruktoz miktarının HPLC analizleri ile belirlenmesi.

Ekstraktlar	Ekstraksiyon Yöntemi	Şeker (% w/v)		
		Glukoz	Fruktoz	Toplam Şeker
E1-M	MAE	0.96	1.34	2.3
E2-M		3.9	5.7	9.6
E3-M		4.42	5.34	9.76
E1-U	UAE	0.2	0.1	0.3
E2-U		4.1	5.2	9.3
E3-U		2.84	3.56	6.4

4.2. Kuşburnu Ekstraktlarının pH Değerlerinin Belirlenmesi

UAE ve MAE ekstraktlarının pH değeri 45 °C sıcaklıkta pH metre cihazı (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda elde edilen pH değerleri Tablo 4.2’de verildi. MAE ekstraktlarından E1-M ekstraktının pH değeri 3.71, E2-M ekstraktının pH değeri 3.66, E3-M ekstraktının pH değeri 3.69 olarak ölçüldü. UAE ekstraktlarından E1-U ekstraktının pH değeri 3.57, E2-U ekstraktının pH değeri 3.56, E3-U ekstraktının pH değeri 3.72 olarak belirlendi [Tablo 4.2].

Tablo 4.2: UAE ve MAE yöntemiyle ve farklı çözücüler ile hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının 45 °C sıcaklıktaki pH değerleri.

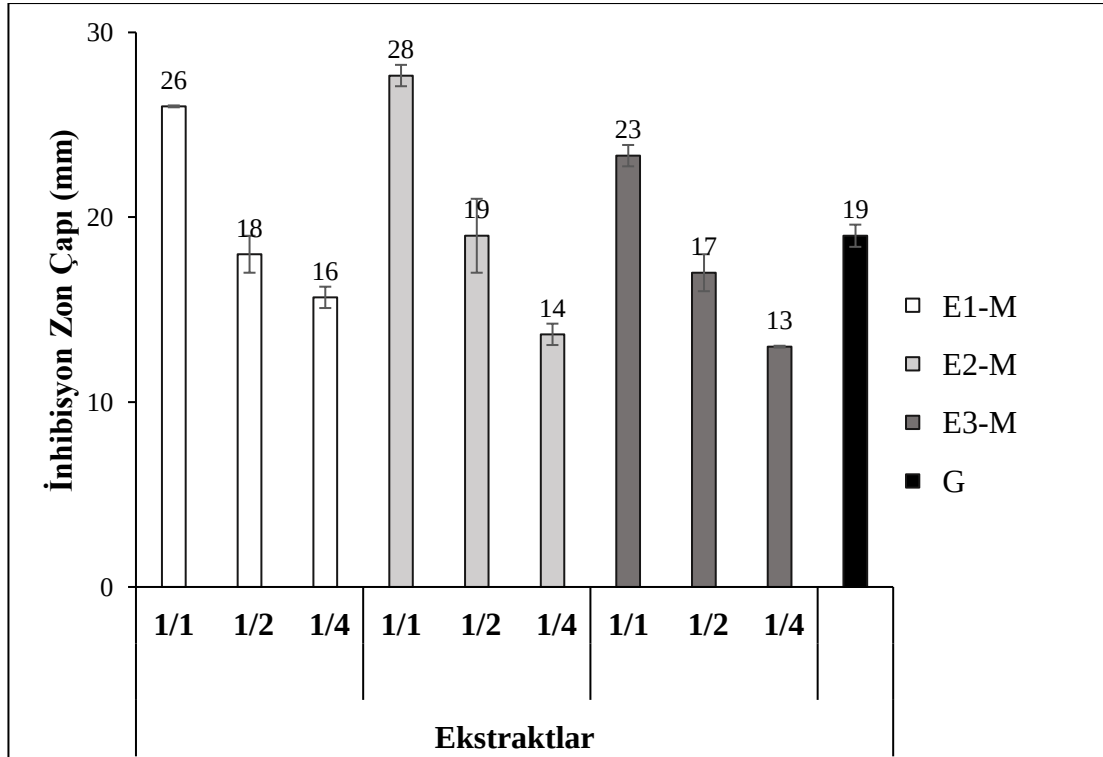
Ekstraktlar	pH Değeri (45 °C)
E1-M	3.71
E2-M	3.66
E3-M	3.69
E1-U	3.57
E2-U	3.56
E3-U	3.72

4.3. Kuşburnu Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

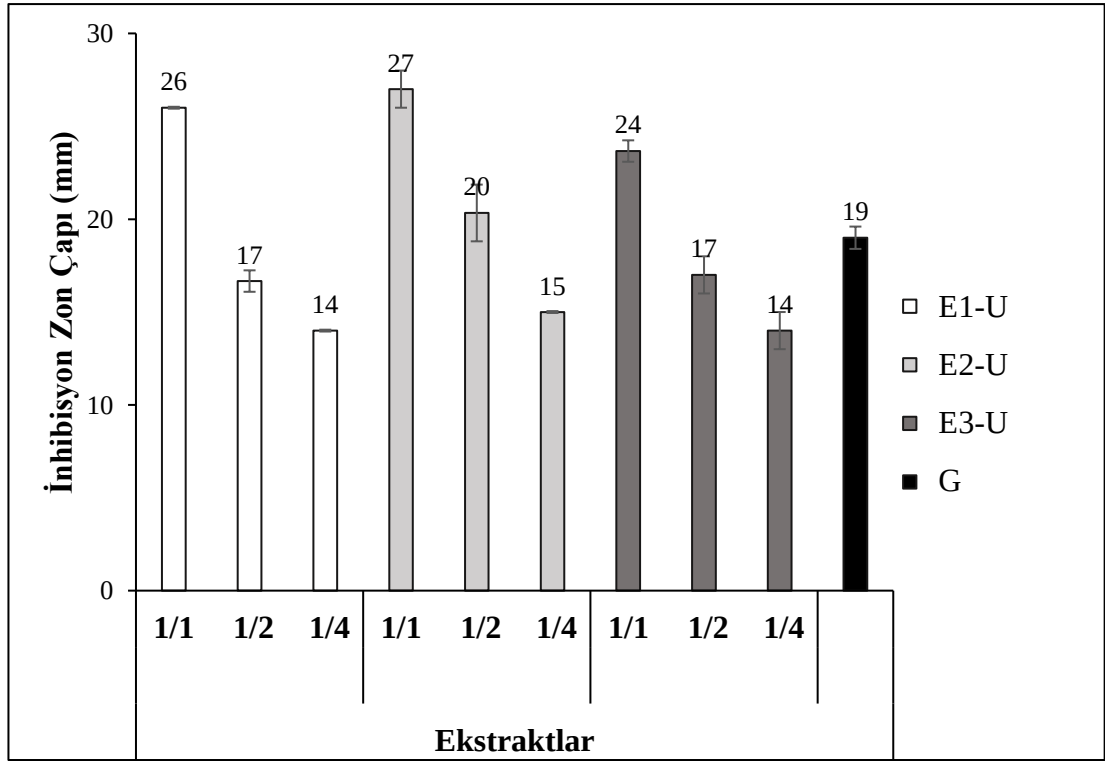
Farklı çözücü ve ekstraksiyon metodu ile hazırlanan farklı oranlarda seyreltilen kuşburnu ekstraktlarının agar kuyu difüzyonu yöntemi ile *Paenibacillus sp.* 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri incelendi. Farklı oranlarda seyreltilen ve direkt kullanılan ekstraktların antimikrobiyal etkileri, ön kültür işlemi tamamlanan ve 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) olacak şekilde seyreltilen bakterilerin kültürlerinden 100 µl alınarak LB besiyerine yayma ekim yapıldı. Yayma ekim sonrası açılan 7 mm çapındaki kuyulara 40'ar µl ekstrakt yüklenmesi yapıldı. İnkübasyon sonrası oluşan zon çapları kuyu çapı (7 mm) dahil edilerek hesaplandı. Kontrol olarak gentamisin antibiyotiği (10 µg/mL) [Pushparaj Selvadoss et al., 2018] kullanıldı.

MAE yöntemi ile hazırlanan ekstraktların *Paenibacillus sp.* 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; E1-M ekstraktı ile 26-16 mm arası, E2-M ekstraktı ile 28-14 mm arası, E3-M ekstraktı ile 23-13 mm arası inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirlendi [Şekil 4.1]. UAE yöntemi ile hazırlanan ekstraktların *Paenibacillus sp.* 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde ise; E1-U ekstraktı ile 26-14 mm arası, E2-U ekstraktı ile 27-15 mm arası, E3-U ekstraktı ile 24-14 mm arası inhibisyon çapı belirlendi [Şekil 4.2]. Hazırlanan ekstraktların seyreltme oranları arttıkça inhibisyon zon çapında azalma belirlendi [Şekil 4.1 ve Şekil 4.2].

Direkt uygulanan ekstrakt analizleri incelendiğinde *Paenibacillus sp.* 32O-W'a karşı en yüksek inhibisyon zonu E2-M ekstraktı ile 28 mm, en düşük inhibisyon zonunun ise E3-M ekstraktı ile 23 mm olduğu belirlendi. 1/2 oranında seyreltilen ekstraktların *Paenibacillus sp.* 32O-W'a karşı en yüksek inhibisyon zonu E2-U ekstraktı ile 20 mm, en düşük inhibisyon zonu E3-M, E1-U, E3-U ekstraktları ile 17 mm olduğu saptandı. 1/4 oranında seyreltilen ekstraktların ise *Paenibacillus sp.* 32O-W'ye karşı en yüksek E1-M ekstraktı ile 16 mm inhibisyon zonu oluşturduğu, en düşük ise E3-M ekstraktı ile 13 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotiği (10 µg/mL) *Paenibacillus sp.* 32O-W'a karşı 19 mm inhibisyon zonu oluşturduğu saptandı. MAE ve UAE yöntemiyle hazırlanan ve seyreltme yapılmadan uygulanan ekstraktların antimikrobiyal etkisinin gentamisin antibiyotiğinden (10 µg/mL) daha fazla etkiye sahip olduğu ($p<0.05$), 1/2 oranında seyreltilen ekstraktların gentamisin antibiyotiğine (10 µg/mL) eşit/yakın etkiye sahip olduğu belirlendi ($p>0.05$). [Şekil 4.1 ve Şekil 4.2].



Şekil 4.1: MAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-M, E2-M ve E3-M) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) *Paenibacillus sp.* 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

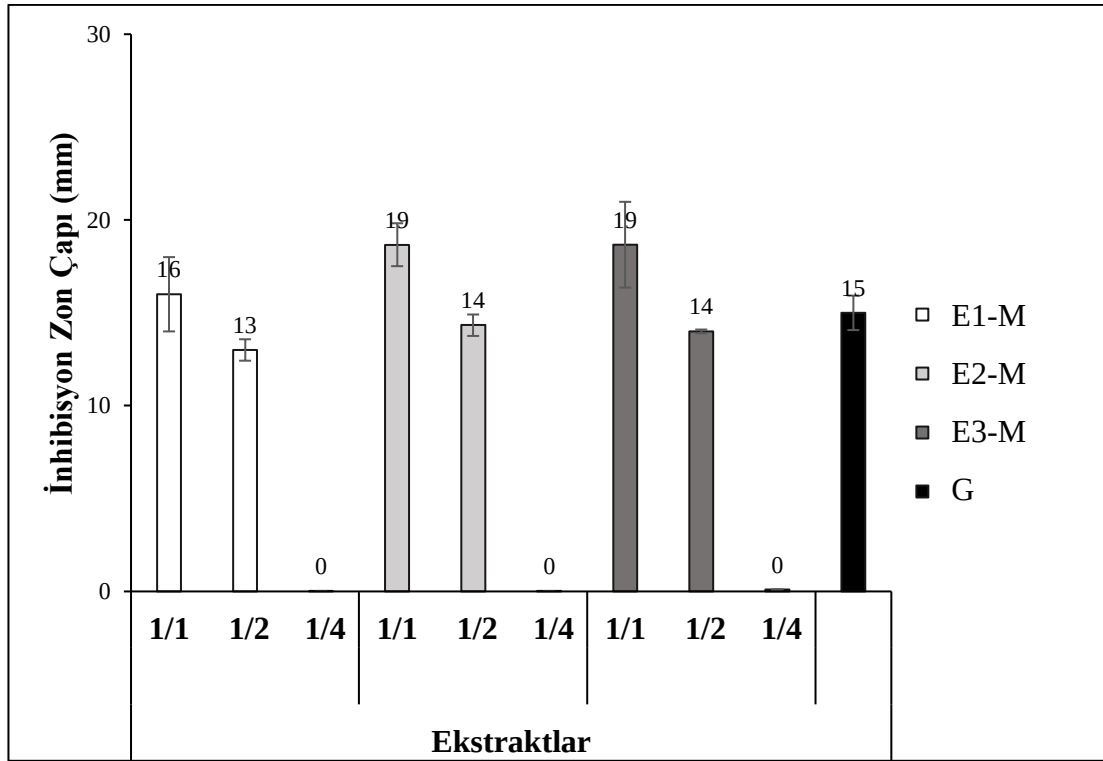


Şekil 4.2: UAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-U, E2-U ve E3-U) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) *Paenibacillus* sp. 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkileri. (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

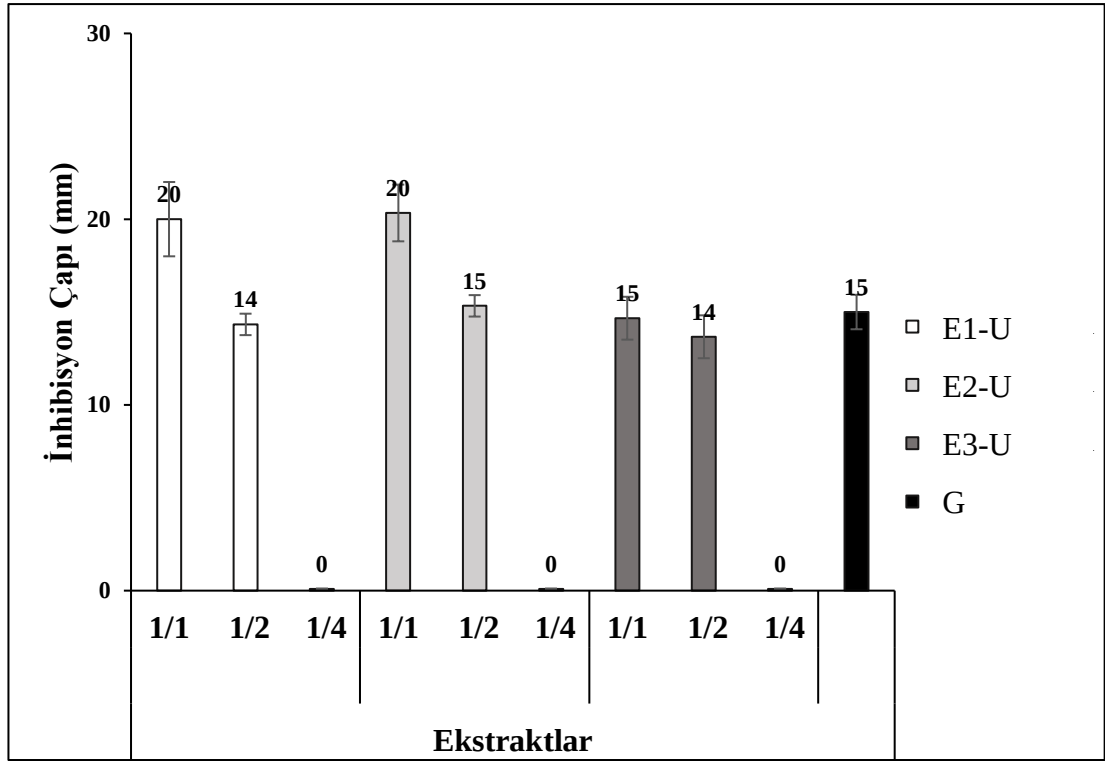
MAE yöntemi ile hazırlanan ekstraktların *P. naphthalenovorans* 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; E1-M ekstraktı ile 16-13 mm arası, E2-M ekstraktı ile 19-14 mm arası, E3-M ekstraktı ile 20-14 mm arası zon çapı oluşturduğu belirlendi [Şekil 4.3]. UAE yöntemi ile hazırlanan ekstraktların *P. naphthalenovorans* 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde ise; E1-U ekstraktı ile 20-14 mm arası, E2-U ekstraktı ile 20-15 mm arası, E3-U ekstraktı ile 15-14 mm arası inhibisyon çapı oluşturduğu belirlendi [Şekil 4.4]. Hazırlanan ekstraktların seyreltme oranları arttıkça inhibisyon zon çapında azalma belirlendi. 1/4 seyreltme oranına sahip ekstrakt uygulamalarında inhibisyon zonu elde edilmedi [Şekil 4.3 ve Şekil 4.4].

Direkt (1/1) ekstrakt uygulamaları incelendiğinde *P. naphthalenovorans* 32O-Y'ye karşı en yüksek inhibisyon zonu E1-U ve E2-U ekstraktları ile 20 mm, en düşük inhibisyon zonu ise E3-U ekstraktı ile 15 mm olarak belirlendi. 1/2 oranında seyreltilen ekstraktların *P. naphthalenovorans* 32O-Y'ye karşı en yüksek antimikrobiyal etki E2-U ekstraktı ile 15 mm inhibisyon zonu, en düşük antimikrobiyal etki ise E1-M ekstraktı ile 13 mm olarak belirlendi. *P. naphthalenovorans* 32O-Y'ye karşı gentamisin

antibiyotiğinin (10 µg/mL) 15 mm inhibisyon zonu meydana getirdiği saptandı. Ekstraktlar arasında seyreltme yapılmadan uygulanan E3-U ekstraktı dışındaki diğer ekstraktların etkisinin gentamisin antibiyotiğinin (10 µg/mL) etkisinden fazla antimikrobiyal etkiye neden olduğu gözlemlendi. 1/2 seyreltme ile uygulanan ekstraktlardan E2-U ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin gentamisin antibiyotiğinin (10 µg/mL) antimikrobiyal etkisine eşit, diğer 1/2 oranın seyreltilen ekstraktların antimikrobiyal etkisinin ise gentamisin antibiyotiğinin (10 µg/mL) antimikrobiyal etkisine yakın olduğu belirlendi [Şekil 4.3 ve Şekil 4.4].



Şekil 4.3: MAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-M, E2-M ve E3-M) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkileri. (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.



Şekil 4.4: UAE yöntemi ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktlarının (E1-U, E2-U ve E3-U) ve farklı konsantrasyonlarının (1, 1/2 ve 1/4) *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkileri. (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

Genel olarak incelendiğinde MAE ve UAE yöntemleriyle hazırlanan 1/2 oranında seyreltilmiş ekstraktların antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiğinin (10 µg/mL) antimikrobiyal etkisine benzer olduğu gözlemlendi [Şekil 4.3 ve Şekil 4.4].

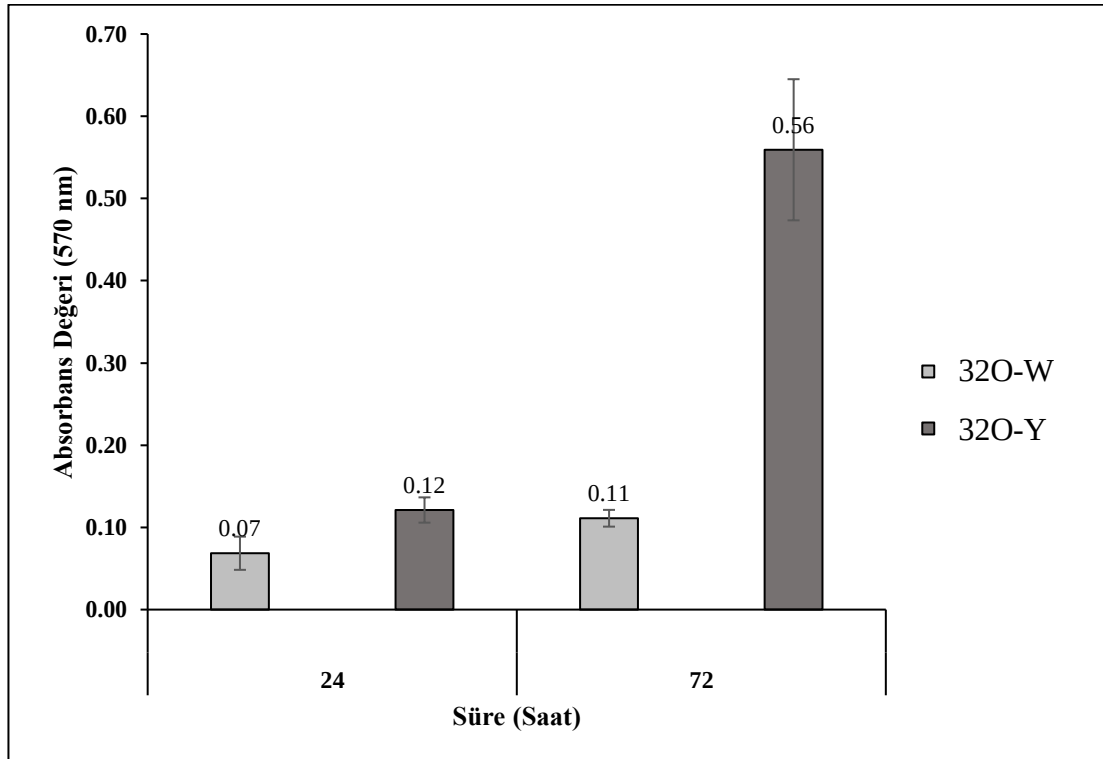
4.4. TSB-L Besiyerinde Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi

Paenibacillus sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşlarının steril 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında, TSB-L besiyeri içerisinde, 45 °C sıcaklıkta, 24 ve 72 saat boyunca statik koşullar altında inkübasyonu sağlanarak biyofilm oluşumu sağlandı.

Paenibacillus suşlarının 24 saatlik inkübasyonu neticesinde *Paenibacillus sp.* 32O-W suşu biyofilmi 0.07 OD₅₇₀ absorbans değeri, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu biyofilmi ise 0.12 OD₅₇₀ absorbans değeri olarak ölçüldü [Şekil 4.5]. Stepanovic et al.,

(2007) çalışması referans alınarak biyofilm oluşumları değerlendirildiğinde 24 saatlik genç biyofilm oluşumu sonucunda *Paenibacillus sp.* 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunda zayıf biyofilm oluşumu belirlendi.

Paenibacillus suşlarının 72 saatlik inkübasyonu sonucunda olgun biyofilm oluşumu sonrasında *Paenibacillus sp.* 32O-W suşu biyofilminde 0.12 OD₅₇₀ absorbans değeri, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu biyofilminde ise 0.56 OD₅₇₀ absorbans değeri sonucu ölçüldü [Şekil 4.5]. 72 saatlik inkübasyon sonucunda *Paenibacillus sp.* 32O-W suşunda zayıf biyofilm üretimi, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunda ise kuvvetli biyofilm üretimi olduğu değerlendirildi. TSB-L besiyerinde termofilik *Paenibacillus* suşlarının inkübasyon süresi arttıkça ürettikleri biyofilm miktarında artış olduğu sonucuna varıldı. İki suş arasında biyofilm oluşturma potansiyeli açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).



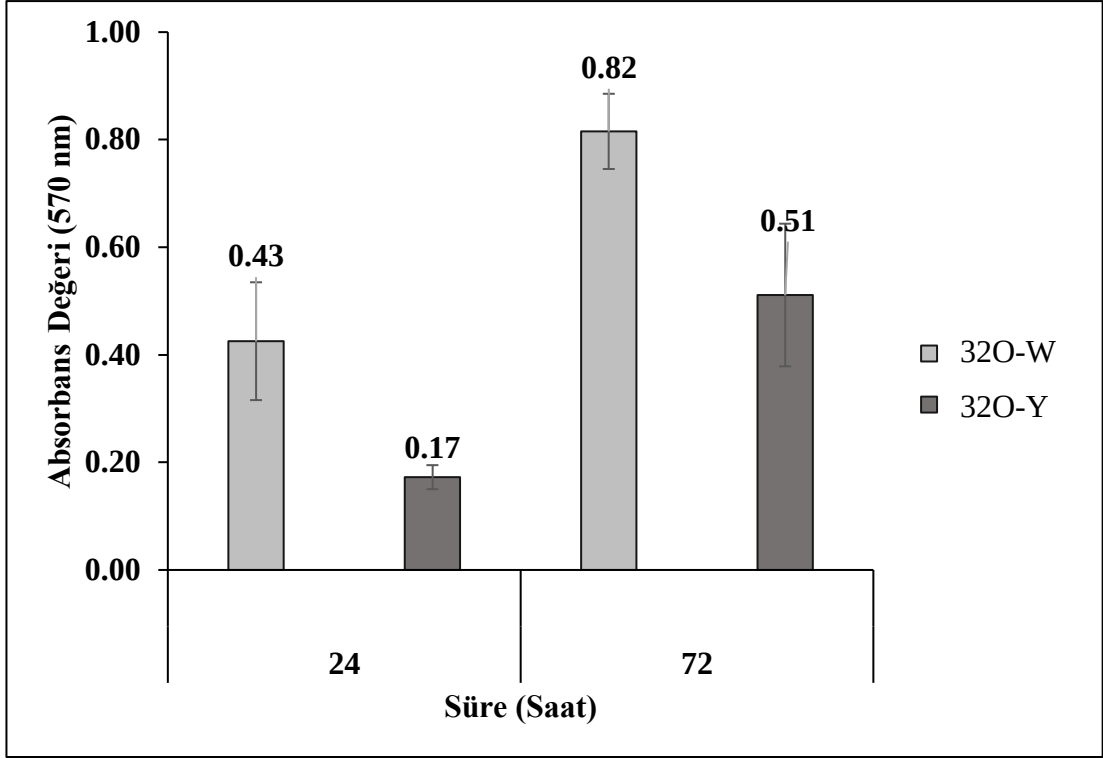
Şekil 4.5: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-L besiyeri içerisinde 24 ve 72 saat inkübasyonu sonucu oluşan biyofilm absorbans değerleri (570 nm). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

4.5. TSB-S Besiyerinde Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi

Paenibacillus sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşlarının biyofilm oluşumu için steril 6 kuyulu hücre kültürü plakasında, TSB-S besiyeri içerisinde, 45 °C sıcaklıkta, 24 ve 72 saat boyunca statik koşullar altında inkübasyonu sağlanarak biyofilm oluşumu sağlandı.

Paenibacillus suşlarının 24 saatlik inkübasyonu neticesinde *Paenibacillus sp.* 32O-W suşu biyofilmi 0.43 OD₅₇₀ absorbans değeri, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu biyofilmi ise 0.17 OD₅₇₀ absorbans değeri olarak ölçüldü [Şekil 4.6]. 24 saatlik genç biyofilm oluşumu sonucunda *Paenibacillus sp.* 32O-W suşunda zayıf biyofilm üretimi, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunda ise biyofilm oluşumunun olmadığı değerlendirildi.

Paenibacillus suşlarının 72 saatlik inkübasyonu sonucunda olgun biyofilm oluşumu gözlemlendi ve *Paenibacillus sp.* 32O-W suşu biyofilminde 0.82 OD₅₇₀ absorbans değeri, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu biyofilminde ise 0.5 OD₅₇₀ absorbans değeri sonucu ölçüldü [Şekil 4.6]. 72 saatlik inkübasyon sonucunda *Paenibacillus sp.* 32O-W suşunda orta düzeyde biyofilm üretimi, *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunda ise zayıf biyofilm üretimi olduğu değerlendirildi. TSB-S besiyerinde termofilik *Paenibacillus* suşlarının inkübasyon süresi arttıkça ürettikleri biyofilm miktarında artış olduğu sonucuna varıldı. İki suş arasında biyofilm oluşturma potansiyeli açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 4.6: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-S besiyeri içerisinde 24 ve 72 saat inkübasyonu sonucu oluşan biyofilm absorbans değerleri (570 nm). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

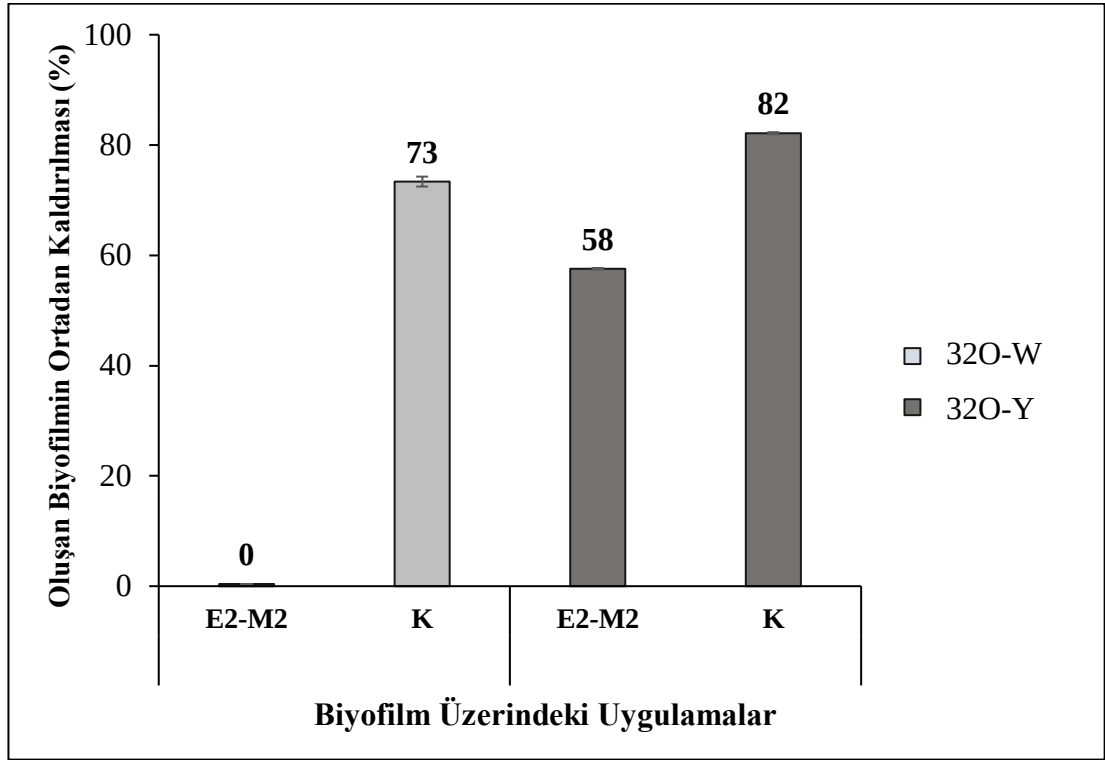
4.6. TSB-S Besiyerinde Biyofilm Oluşumlarının Ortadan Kaldırılması

Paenibacillus sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşları tarafından oluşturulan biyofilmin ortadan kaldırılmasına E2-M2 kuşburnu ekstraktının etkisini belirlemek amacıyla 6 kuyulu hücre kültürü plakasında, TSB-S besiyeri içerisinde, 45 °C sıcaklıkta, 24 ve 72 saat boyunca statik koşullar altında ilgili bakterilerin inkübasyonu ile biyofilm oluşumu sağlandı. Oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için E2-M2 ekstraktı ve gıda endüstrisinde kullanıldığı bilinen klor çözeltisi (200 ppm, K) uygulandı. Uygulama sonrası yüzeye yapışan hücre miktarını belirleyebilmek için kuyular biyofilm oluşumunu belirlemek için yapılan aşamalara tabii tutuldu.

24 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan genç ve olgun biyofilmlerin ortadan kaldırılmasında E2-M2 ekstraktı ve klorun (200 ppm, K) etkisi incelendi.

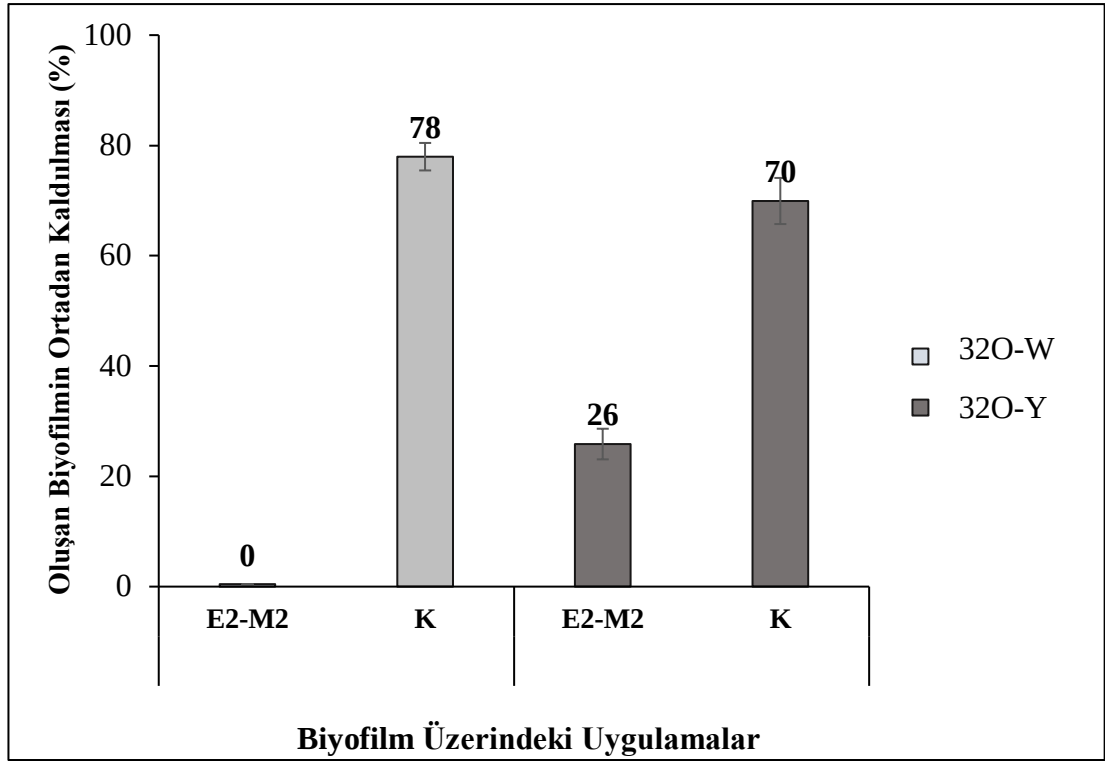
24 saatlik inkübasyon sonucunda E2-M2 ekstraktının *Paenibacillus sp.* 32O-W suşunun oluşan biyofilmini ortadan kaldırmada etkisinin olmadığı (% 0), klorun ise % 73 oranında ortadan kaldırdığı belirlendi. Diğer yandan E2-M2 ekstraktının *P.*

naphthalenovorans 32O-Y suşu biyofilmini % 58 oranında, klorun ise % 82 oranında ortadan kaldırdığı saptandı [Şekil 4.7].



Şekil 4.7: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-S besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan biyofilmin E2-M2 ekstraktı ve K (klor, 200 ppm) uygulaması ile ortadan kaldırılma (%) oranları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

72 saatlik inkübasyon sonucunda E2-M2 ekstraktının *Paenibacillus sp.* 32O-W suşunun oluşan biyofilmini ortadan kaldırmada etkisinin olmadığı (% 0,) klorun ise % 78 oranında ortadan kaldırdığı belirlendi. Bunun yanı sıra, E2-M2 ekstraktının *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu biyofilmini % 26 oranında, klorun ise % 70 oranında ortadan kaldırdığı belirlendi [Şekil 4.8].



Şekil 4.8: *Paenibacillus* suşlarının (32O-W ve 32O-Y) TSB-S besiyerinde 72 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan biyofilmin E2-M2 ekstraktı ve K (klor, 200 ppm) uygulaması ile ortadan kaldırılma (%) oranları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

Sonuç olarak, E2-M2 ekstraktının *Paenibacillus sp.* 32O-W suşu erken ve geç biyofilminin ortadan kaldırılmasında etkisi olmadığı ($p>0.05$), *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu üzerinde ise erken biyofilm oluşumunda (24 saat) ortadan kaldırma etkisinin geç biyofilm oluşumundaki (72 saat) ortadan kaldırma etkisinden daha fazla olduğu ($p<0.05$) gözlemlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt endüstrisinde termofilik bakterilerin neden olduğu biyofilmler süt ve süt ürünlerinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır [Teh et al., 2015]. Bakterilerin oluşturduğu bu biyofilmlerin giderilmesinde günümüzde kullanılan temizlik ajanları yüzeyde kalıntı bırakabilme, yüzeyi aşındırma, biyofilmin tam ortadan kaldırmama, insan sağlığına olumsuz etkiye sebep olma gibi sorunlara neden olmaktadır [Güler ve Can, 2017; Dervişoğlu ve ark., 2013]. Bu nedenlerden dolayı biyofilm oluşumunun kontrol edilmesinde günümüzde doğal, ekonomik, kolay elde edilen antibiyofilm ve antimikrobiyal özelliğe sahip ajan arayışı kaçınılmaz olmaktadır [Unlu et al., 2018; Srey et al., 2013].

Bu çalışmada; kuşburnu meyvesinin MAE ve UAE yöntemleriyle elde edilen ekstraktlarının şeker içeriği ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y ve *Paenibacillus* sp.32O-W suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Sonrasında *P. naphthalenovorans* 32O-Y ve *Paenibacillus* sp.32O-W suşlarının TSB-L ve TSB-S besiyerinde biyofilm oluşturma potansiyelleri ve kullanım kolaylığı sağlayan MAE ekstraktlarından E2-M2 ekstraktının % 4 laktoza eşdeğer süt tozu içeren TSB (TSB-S) besiyerinde bu suşlar üzerindeki antibiyofilm etkileri araştırılmıştır.

Kuşburnu meyvesinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktlardaki şeker içeriği incelendiğinde MAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktlarda fruktoz içeriği en fazla % 5.7 w/v şeker oranıyla E2-M ekstraktında, glukoz içeriği en fazla % 4.42 w/v şeker oranıyla E3-M ekstraktında, en fazla toplam şeker miktarı ise % 9.76 w/v şeker oranı ile E3-M ekstraktında belirlenmiştir. En düşük glukoz, fruktoz ve toplam şeker miktarı ise (sırasıyla % 0.96 w/v, % 1.34 w/v, % 2.3 w/v şeker oranı) E1-M ekstraktında ölçülmüştür. Kuşburnu ekstraksiyonunda MAE yönteminin ve farklı çözücülerin kullanılması ile kuşburnu içerisinde farklı oranlarda şeker içeriğinin ortaya çıktığı ve çözücü olarak su kullanılması yerine alkol + su solüsyonunun kullanılması ile daha etkili şeker içeriğinin ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır.

UAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktlarda glukoz içeriği en fazla % 4.1 w/v şeker oranıyla E2-U ekstraktında, fruktoz içeriği en fazla E2-U ekstraktında, toplam şeker miktarı ise yine E2-U ekstraktında belirlenirken en az glukoz ve fruktoz oranları (sırasıyla % 0.2 w/v ve % 0.1 w/v şeker oranı) E1-U ekstraktında belirlenmiştir. Kuşburnu ekstraksiyonunda UAE yönteminin ve farklı çözücülerin kullanılması ile

kuşburnu içerisinde farklı oranlarda şeker içeriğinin ortaya çıktığı ve çözücü olarak su kullanılması yerine alkol + su solüsyonunun kullanılması ile daha etkili şeker içeriğinin ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır.

E1-U ekstraktı haricindeki MAE ve UAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktlarda fruktoz miktarının glukoz miktarından fazla olduğu belirlenmiştir. MAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktların toplam şeker miktarı (glukoz + fruktoz) aynı çözücü kullanılmasına rağmen UAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktlardaki şeker miktarından fazla olduğu saptanmıştır. Ekstraktlardaki şeker içeriğinin ortaya çıkarılmasında farklı ekstraksiyon yöntemlerinin farklı oranlarda etki ettiği ve MAE yönteminin UAE yöntemine göre şeker içeriğini ortaya çıkartmada daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Erler ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada *Paenibacillus larvae* bakterisi üzerinde ortamdaki fazla şeker ve balın inhibitör etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Ortamdaki şeker miktarı bakterilerinin türüne göre biyofilm oluşumunu teşvik edici de olabilmektedir [Sar and Akbas, 2019; Unlu et al., 2018; Assaf et al., 2014]. Ortamda glukoz ve fruktoz şekerlerinin fazla olması ile patojenler için aşırı ozmotik stres oluşabilmekte ve bunun neticesinde güçlü antimikrobiyal etki gözlemlenebilmektedir [Erler et al., 2014]. Biyofilm üzerindeki yüksek osmotik stres sonucunda biyofilm genişlemesi ve biyofilm yapısının bozulması gözlemlenebilmektedir [Liu et al., 2020]. Bunun neticesinde MAE ekstraktlarındaki şeker miktarının UAE ekstraktlarındaki şeker miktarından fazla olması ile MAE ekstraktlarının osmotik stresten dolayı açığa çıkan antimikrobiyal etkiye daha fazla sahip olması beklenmektedir.

Okan ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada % 80 etanol çözücüsüyle hazırlanan kuşburnu ekstraktında glukoz miktarı % 3.53, fruktoz miktarı % 4.85 olarak belirlenmiştir. Öz ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada, su ile ekstraksiyonu yapılmış 2013 yılında toplanan kuşburnu meyvesinin 9.21 g/100 g fruktoz, 9.02 g/100 g glukoz; 2014 yılında toplanan kuşburnu meyvesinin ise 9.06 g/100 g fruktoz, 7.23 g/100 g glukoz içerdiğini saptamışlardır. Mihaylova ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları çalışmada MAE ile ekstraksiyonu yapılan kuşburnu meyvesinde glukoz miktarını % 3.99 g/100 g kuru ağırlık, fruktoz miktarını ise % 6.51 g/100 g kuru ağırlık olarak belirlemişlerdir. Murathan ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları bir başka çalışmada kuşburnu içerisindeki glukoz miktarı 8.05 g/100 g, fruktoz miktarı 5.03 g/100 g olarak belirlenmiştir. Özrenk ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada ise

kuşburnu içerisindeki fruktoz miktarı en fazla % 14.76 g/100 g, glukoz ise en fazla % 12.94 g/100 g olarak belirlenirken çalışmada yapılan tüm karşılaştırmalarda fruktoz içeriğinin glukoz içeriğinden fazla olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde kuşburnu içerisindeki şeker miktarının birbirlerinden farklılık gösterdiği ve kullanılan çözücü ve ekstraksiyon yönteminin meyve içerisindeki şekeri farklı oranlarda ortaya çıkardığı sonucuna varılmıştır.

Medveckiene ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada liyofilize edilmiş ve metanol çözücüsü kullanılarak UAE yöntemiyle hazırladıkları kuşburnu ekstraktında gallik asit miktarı 22.67 mg/100 g kuru ağırlık olarak ölçülürken, Okan ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ise metanol çözücüsü ile hazırlanan kuşburnu ekstraktının gallik asit miktarı 1.41 µg/g olarak ölçülmüştür. Demir ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir başka çalışmada ise gallik asit ise 12.67 mg/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Literatürde kuşburnu içerisindeki gallik asit miktarının çalışmalar arasında farklılık gösterdiği ve kullanılan çözücü ve ekstraksiyon yönteminin meyve içerisindeki gallik asidi farklı miktarda ortaya çıkardığı sonucuna varılmıştır.

Okan ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları çalışmada metanol ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktının toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı 5.91 mg GAE/g olarak; Jemaa ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir diğer çalışmada metanol ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktının TFB miktarı ise 21.918 mg GAE/g olarak; Murathan ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada ise metanol ile hazırlanmış kuşburnu ekstraktının TFB miktarı 62.98 mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Tahirović ve Bašić'in (2017) yaptığı çalışmada % 100 su ile hazırlanan kuşburnu ekstraktının TFB miktarı 69.05 mg GAE/g, % 50 metanol:su ile hazırlanan kuşburnu ekstraktının TFB miktarı 78.83 mg GAE/g, % 50 etanol:su ile hazırlanan kuşburnu ekstraktının TFB miktarı ise 72.69 mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonunda *Rosa canina* meyve özlerindeki biyoaktif bileşiklerin içeriğinin, ekstraksiyon yapımına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. İlbay ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada % 100 su, % 100 metanol, % 100 etanol, % 50 etanol:su, % 50 metanol:su solüsyonlarını kullanarak UAE yöntemiyle hazırladıkları kuşburnu ekstraktlarının TFB miktarlarını incelediklerinde % 100 etanol içeren ekstraktın 7.54 mg GAE/g, % 100 metanol içeren ekstraktın 18.36 mg GAE/g, % 50 etanol içeren ekstraktın 29.88 mg GAE/g, % 50 metanol içeren ekstraktın 49.26 mg GAE/g, % 100 su içeren ekstraktın ise 48.59 mg GAE/g içerdiğini belirlemiştir. Deney sonucunda alkole + su solüsyonlarıyla

ekstraksiyonun yapılması ile meyve içerisinde açığa TFB miktarının arttırdığı sonucuna varılmıştır.

TFB miktarı aynı zamanda bir meyvenin antioksidan kapasitesinin bir göstergesi olup genellikle bir antioksidan testi olarak kullanılmaktadır [Okan et al., 2019], bu sebeple meyve içerisindeki antioksidan kapasitesinin ekstraksiyonda kullanılan çözücü ve ekstraksiyon yönteminden etkilendiği düşünülmektedir. Kuşburnu meyvesinin ekstraktlarındaki TFB miktarı literatürde birbirine yakın veya farklı sonuçlar içermektedir. Kullanılan çözücü ve ekstraksiyon yöntemi, meyvenin genotipi ve yetiştirildiği alanın meyve içerisindeki şeker, galik asit, toplam fenolik madde içeriklerine etki ettiği düşünülmektedir [Koczka et al., 2018; Demir et al., 2014; İlbay et al., 2013].

MAE ekstraktlarının ve UAE ekstraktlarının pH değerleri 3.56-3.72 arasında ölçüldü. MAE ve UAE ekstraktlarının pH değerleri arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). Kullanılan ekstraksiyon yönteminin pH üzerinde etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

MAE ve UAE ekstraktları arasında en düşük pH değerine sahip olan ekstrakt % 50 oranında etanol çözücüsü kullanılarak hazırlanmış E2-M (pH: 3.66) ve E2-U (pH: 3.56) ekstraktında gözlemlenmiştir. Ekstraktlar arasındaki küçük miktardaki pH farklılıklarının kullanılan çözücünün açığa çıkardığı bileşikler neticesinde olduğu düşünülmektedir.

Ulusoy ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada, kuşburnu çayından elde edilen ekstraktın pH değerinin yaklaşık 2.4 değerinde olduğunu bularak ekstraktların asidik olduğunu belirlemişlerdir. Murathan ve arkadaşlarının (2016) kuşburnu türlerinin biyoaktif içeriğini belirlemek için yaptığı çalışmada, tüm kuşburnu türlerini pH değerini asidik olarak ve *R. canina* türü kuşburnunun ise pH değerini ise 3.5 olarak bulmuşlardır. Asidik pH değerlerinin elde edilmesi meyve içerisindeki organik asitlerin varlığı ile açıklanmaktadır [Murathan et al., 2016; Tejero-Sariñena et al., 2012]. Asidik pH, patojenik bakteri kolonizasyonunu engelleyerek antimikrobiyal etkiye katkı sağlamaktadır [Proksch, 2018]. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen pH değerleri ile bu tez çalışmasında ölçülen pH değerinin asidik olması literatür ile uyumludur.

Kuşburnu ekstraktlarının termofilik *Paenibacillus* suşları (32O-W ve 32O-Y) üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve kontrol olarak gentamisin (10 µg/mL) kullanılmıştır. MAE yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktlar arasında 32O-W

üzerinde en fazla antimikrobiyal etki 28 mm inhibisyon zon çapı oluşmasını sağlayan E2-M ekstraktının direkt konsantrasyon (E2-M1) uygulamasında olduğu, en düşük antimikrobiyal etki ise 13 mm inhibisyon zon çapı oluşmasını sağlayan E3-M ekstraktının 1/4 konsantrasyon (E3-M4) uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan gentamisin 320-W üzerindeki antimikrobiyal etkisi 19 mm inhibisyon zon çapı oluşumu sağlamış olup MAE ekstraktlarının direkt konsantrasyon uygulamasının (E1-M1: 26 mm, E2-M1: 28 mm, E3-M1: 23 mm) etkisinden düşük olduğu, MAE ekstraktlarının 1/4 konsantrasyon uygulamasının (E1-M4: 16 mm, E2-M4: 14 mm, E3-M4: 13 mm) etkisinden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ekstraktların 1/2 konsantrasyondaki antimikrobiyal etkisi incelendiğinde E1-M2 ekstraktı 18 mm inhibisyon zon çapı oluşumu, E2-M2 ekstraktı 19 mm inhibisyon zon oluşumu, E3-M2 ekstraktı ise 17 mm inhibisyon zon oluşumu sağlayarak gentamisin antibiyotiğinin 320-W üzerindeki antimikrobiyal etkisine eş sayılabilecek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

UAE yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktlar arasında 320-W üzerinde en fazla antimikrobiyal etki 27 mm inhibisyon zon çapı oluşmasını sağlayan E2-U ekstraktının direkt konsantrasyon (E2-U1) uygulamasında olduğu, en düşük antimikrobiyal etki ise 14 mm inhibisyon zon çapı oluşmasını sağlayan E1-U ve E3-U ekstraktlarının 1/4 konsantrasyon (E1-U4 ve E3-U4) uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan gentamisin 320-W üzerindeki antimikrobiyal etkisi 19 mm inhibisyon zon çapı oluşumu sağlamış olup UAE ekstraktlarının direkt konsantrasyon uygulamasının (E1-U1:26 mm, E2-U1:27 mm, E3-M1:24 mm) etkisinden düşük olduğu, UAE ekstraktlarının 1/4 konsantrasyon uygulamasının (E1-U4:14 mm, E2-U4:15 mm, E3-U4:14 mm) etkisinden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ekstraktların 1/2 konsantrasyondaki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde E1-U2 ekstraktı 17 mm inhibisyon zon çapı oluşumu, E2-U2 ekstraktı 20 mm inhibisyon zon oluşumu, E3-U2 ekstraktı ise 17 mm inhibisyon zon oluşumu sağlayarak gentamisin antibiyotiğinin 320-W üzerindeki antimikrobiyal etkisine eş sayılabilecek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

MAE yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktlar arasında *P. naphthalenovorans* 320-Y üzerinde en fazla antimikrobiyal etki 19 mm inhibisyon zon çapı oluşmasını sağlayan E2-M ve E3-M ekstraktlarının direkt konsantrasyon (E2-M1 ve E3-M1) uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan gentamisin 320-Y üzerindeki antimikrobiyal etkisi 15 mm inhibisyon zon çapı oluşumu sağlamış olup

MAE ekstraktlarının direkt konsantrasyon uygulamasının (E1-M1: 16 mm, E2-M1: 19 mm, E3-M1: 19 mm) etkisinden düşük olduğu, MAE ekstraktlarının 1/4 konsantrasyon uygulamasının (E1-M4: 0 mm, E2-M4: 0 mm, E3-M4: 0 mm) etkisinden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ekstraktların 1/2 konsantrasyondaki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde E1-M2 ekstraktı 13 mm inhibisyon zon çapı oluşumu, E2-M2 ekstraktı 14 mm inhibisyon zon oluşumu, E3-M2 ekstraktı ise 14 mm inhibisyon zon oluşumu sağlayarak gentamisin antibiyotiğinin 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkisine eş sayılabilecek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

UAE yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktlar arasında 32O-Y üzerinde en fazla antimikrobiyal etki 20 mm inhibisyon zon çapı oluşmasını sağlayan E1-U ve E2-U ekstraktlarının direkt konsantrasyon (E1-U1 ve E2-U1) uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan gentamisinin (10 µg/mL) *P. naphthalenovorans* 32O-Y üzerindeki antimikrobiyal etkisi 15 mm inhibisyon zon çapı oluşumu sağlamış olup E1-U ve E2-U ekstraktlarının direkt konsantrasyon uygulamasının (E1-U1: 20 mm, E2-U1: 20 mm) etkisinden düşük olduğu, UAE ekstraktlarının 1/4 konsantrasyon uygulamasının (E1-U4: 0 mm, E2-U4: 0 mm, E3-U4: 0 mm) etkisinden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ekstraktların 1/2 konsantrasyondaki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde E1-U2 ekstraktı 14 mm inhibisyon zon çapı oluşumu, E2-U2 ekstraktı 15 mm inhibisyon zon oluşumu, E3-U2 ekstraktı ise 14 mm inhibisyon zon oluşumu sağlayarak gentamisin antibiyotiğinin 32O-W üzerindeki antimikrobiyal etkisine eş sayılabilecek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca E3-U ekstraktının direkt uygulamasının (E3-U1) antimikrobiyal etkisi 15 mm inhibisyon zon çapı oluşumu sağlamış olup 1/2 konsantrasyondaki ekstraktlar ve gentamisin ile eşit sayılabilecek etki göstermiştir.

MAE ve UAE ekstraktlarının uygulama konsantrasyonu azaldıkça *Paenibacillus* sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y üzerinde elde edilen antimikrobiyal etkinin de azaldığı gözlemlenmiştir. Farklı çözücülerin kullanılması ekstraktların farklı antimikrobiyal etki göstermesine neden olmuştur. 32O-W üzerinde MAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkinliği en fazla % 50 etanol:su çözücüsü ile hazırlanan ekstrakt ile görülürken daha sonra sırasıyla % 100 Dsu çözücüsü, % 50 metanol:su çözücüsünde belirlenmiştir. 32O-Y üzerinde MAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkinliği % 50 etanol:su çözücüsü

ve % 50 metanol:su çözücüsü kullanılan ekstraktlarında eşit iken % 100 Dsu çözücüsü kullanılan ekstrakttan daha fazladır.

32O-W üzerinde UAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkinliği en fazla % 50 etanol:su çözücüsü ile hazırlanan ekstrakt ile görülürken daha sonra sırasıyla % 100 Dsu çözücüsü, % 50 metanol:su çözücüsünde belirlenerek MAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktlardaki gibi olduğu saptanmıştır. 32O-Y üzerinde UAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkinliği % 50 etanol:su çözücüsü ve % 50 metanol:su çözücüsü kullanılan ekstraktlarında eşit iken % 100 Dsu çözücüsü kullanılan ekstrakttan daha fazla olduğu belirlenerek MAE yöntemiyle hazırlanan ekstraktlardaki gibi olduğu saptanmıştır.

Ekstrakt yöntemi (MAE veya UAE) farketmeksizin ekstraktın hazırlanmasında kullanılan çözücünün ekstrakta kazandırdığı antimikrobiyal etkinin benzer olduğu saptanmıştır. Direkt uygulanan ekstraktların antimikrobiyal etkisi gentamisinden daha etkin olduğu, 1/2 konsantrasyonda uygulanan ekstraktların antimikrobiyal etkileri ise gentamisine yakın/eşit olduğu belirlenmiştir. MAE yönteminin uygulanması (6 dk) UAE yönteminin uygulanmasına (120 dk) göre daha kısa süre aldığı için ekstraktların hazırlanmasında MAE yönteminin kullanılmasının avantajlı olduğu görülmüştür.

Kuşburnu içerisinde çeşitli organik asitlerin, vitaminlerin, antosiyaninin olduğu bilinmektedir [Medveckiene et al., 2020; Ayati et al., 2018; Murathan et al., 2016; Demir et al., 2014]. Antosiyanin, bakterilerin hücre duvarına zarar vererek antibakteriyel etki gösterebilir [Ma et al., 2019]. Kuşburnu içerisinde diğer vitaminlere oranla fazla miktarda bulunan C vitamini [Ayati et al., 2018], antimikrobiyal etkiye sahiptir [Verghese et al., 2017]. Organik asitlerin de antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır ve türe özgü olarak antimikrobiyal etki derecesi değişmektedir [Tejero-Sariñena et al., 2012].

Demirkol ve Erturk'ün (2019b) yaptığı çalışmada, kuşburnun da içinde bulunduğu aseton çözücüsü ile ekstrakt ettikleri bitkisel ekstraktların Gram-pozitif, Gram-negatif ve mantarlar üzerinde antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda kuşburnunun *Staphylococcus aureus* üzerinde 10.33 mm inhibisyon zon çapı, *Listeria monocytogenes* üzerinde 11.00 mm inhibisyon zon çapı, *Bacillus cereus* üzerinde 15.33 mm inhibisyon zon çapı, *Escherichia coli* üzerinde 12.00 mm inhibisyon zon çapı, *Proteus vulgaris* üzerinde 11.33 mm inhibisyon zon çapı, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde 11.33 mm inhibisyon zon çapı, *Salmonella typhimurium* üzerinde 12.66 mm inhibisyon zon çapı, *Candida albicans* üzerinde

17.33 mm inhibisyon zon çapı, *Aspergillus niger* üzerinde 16.33 mm inhibisyon zon çapı oluştuğunu belirlemişlerdir. Kullanılan disk yarıçapı 6 mm olup, kontrol olarak kullanılan asetonun bakteriler üzerinde 6.66 mm ve 7.00 mm arasında inhibisyon zon oluşturmuştur. Deney sonucunda kuşburnu ekstraktlarının Gram-pozitif, Gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Demirkol ve Ertürk'ün (2019a) yaptıkları bir başka çalışmada ise etanol çözücüsü ile ekstrakt edilen kuşburnunun *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Kontrol olarak % 70 etanol solüsyonu ve 6 mm çaplı diskler kullanılmıştır. *Proteus vulgaris* üzerinde 8 mm inhibisyon zon çapı, *E. coli* üzerinde 9.33 mm inhibisyon zon çapı, *B. cereus* üzerinde 13.33 mm inhibisyon zon çapı, *S. aureus* üzerinde 6 mm inhibisyon zon çapı, *Salmonella typhimurium* üzerinde 10 mm inhibisyon zon çapı, *Listeria monocytogenes* üzerinde 8 mm inhibisyon zon çapı, *P. auroginosa* üzerinde 8 mm inhibisyon zon çapı, *Candida albicans* üzerinde 15.33 mm inhibisyon zon çapı, *Aspergillus niger* üzerinde ise 16.67 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğunu ve % 70 etanol tüm bakteriler üzerinde 6 mm zon oluşturduğunu belirlemişlerdir. Yapılan değerlendirme neticesinde, bu çalışmadan elde edilen sonuçta da gözlemlendiği gibi farklı çözücülerin kullanılması ile hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin farklı olduğu düşünülmektedir.

Rovná ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada, etanol ve metanol çözücülerini kullanarak ekstraksiyonunu sağladıkları kuşburnu çiçeklerinin Gram-negatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda etanolik ekstrakt *E. coli* üzerinde 3.33 mm inhibisyon zon çapı, *P. aeruginosa* üzerinde 4.33 mm inhibisyon zon çapı; metanolik ekstrakt *E. coli* üzerinde 4.33 mm inhibisyon zon çapı, *P. aeruginosa* üzerinde ise 1.66 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirlenmiştir. Rovná ve arkadaşlarının (2020) yaptıkları bir başka çalışmada ise farklı lokasyonlardan topladıkları ve etanol çözücüsüyle hazırladıkları kuşburnu ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Kontrol olarak gentamisin (10 µg/disk) ve distile su kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, *E. coli* üzerinde 14.33-15.67 mm arasında inhibisyon zon çapı, *K. oxytoca* üzerinde 10.67-

12.00 mm arasında inhibisyon zon çapı, *P. auroginosa* üzerinde 9.33-10.67 mm arasında inhibisyon zon çapı, *B. cereus* üzerinde 8.00-8.67 mm arasında inhibisyon zon çapı, *C. perfringens* üzerinde 4.00-5.33 mm arasında inhibisyon zon çapı, *L. monocytogenes* üzerinde ise 5.67-6.67 mm arasında inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, kuşburnunun etanol çözücüsüyle ekstratının *E. coli* üzerinde etkin ama *C. perfringens* etkin olmadığı belirlenmiştir ve kuşburnunun yetiştiği ortamın, genomunun bakteriler üzerindeki antimikrobiyal potansiyelini etkilediği belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda kuşburnu çiçeklerinin kuşburnu meyvesine göre daha az antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve etanol veya metanol kullanılarak hazırlanan kuşburnu ekstratının bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin üstünlüğü kuşburnunun genotipik özelliklerine, bakterinin türüne bağlı olduğu düşünülmektedir.

Ghendov-Moşanu ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları çalışmada % 50 etanol:su çözücüsü kullanarak kuşburnu ve alıç meyvesi ekstraktları hazırlamışlar ve *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda kuşburnunun *S. aureus* üzerinde 16 mm inhibisyon zon çapı, *E. coli* üzerinde 10 mm inhibisyon zon çapı, *K. pneumoniae* üzerinde ise 9 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız % 50 etanol:su çözücüsüyle benzer şekilde yüksek oranda inhibisyon zon çapı elde ettikleri belirlenmiştir. Kullanılan çözücünün içeriğindeki su miktarı da kuşburnunun antimikrobiyal etkisini etkileyen unsurlardan olduğu düşünülmektedir.

Demir ve Ağaoğlu'nun (2020) yaptığı çalışmada kuşburnu ve diğer medikal bitkilerin su çözücüsüyle ve su banyosuyla (UAE) tamamladıkları ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. En yüksek antimikrobiyal etkiyi *E. faecalis* üzerinde 21.8 mm olarak, en düşük antimikrobiyal etkiyi 16.15 mm olarak *S. pyogenes* üzerinde bulmuşlardır. Çalışma sonucunda bizim çalışmamızda olduğu gibi UAE yöntemiyle hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Wang ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışma ile methanol, deiyonize su, etil asetat, kloroform veya hekzan kullanarak hazırladıkları kuşburnu ekstraktlarının *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baylyi* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir.

Araştırma sonucunda özellikle su ve metanol çözücüsüyle hazırlanan ekstraktların mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu kanıtlanmıştır. *P. mirabilis* üzerinde metanolik ekstrakt > sulu ekstrakt > etil asetat ekstraktı; *P. vulgaris* üzerinde metanolik ekstrakt > sulu ekstrakt > etil asetat ekstraktı ve *K. pneumoniae* üzerinde metanolik ekstrakt > hekzan ekstraktı antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu özütler ayrıca *A. baylyi* üzerinde metanolik ekstrakt, *P. aeruginosa* üzerinde metanolik ekstrakt ve *S. pyogenes*'in üzerinde metanolik ekstrakt > sulu ekstrakt antimikrobiyal etki gösterirken, metanol çözümüyle hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotikleri ile kombinasyonu bakterilerin inhibisyonu üzerine sinerjistik etki sağladığı belirlenmiştir. Analiz sonucunda kuşburnu ekstraktının elde edilmesinde kullanılan çözücünün ekstraksiyonda önemli olduğu düşünülmektedir.

Paenibacillus sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşlarının biyofilm oluşturma potansiyeli TSB-L besiyeri içerisinde 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında ve TSB-S besiyeri içerisinde 6 kuyulu hücre kültürü plakasında 24 ve 72 saatlik inkübasyon neticesinde belirlendi.

Deney sonucunda, TSB-L besiyerinde *Paenibacillus* sp. 32O-W 24 saatlik inkübasyon sonucunda 0.069 OD₅₇₀ absorbans değerinde biyofilm oluştururken 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise 0.111 OD₅₇₀ absorbans değerinde biyofilm oluşturduğu belirlendi. Genç biyofilm oluşumu ve olgun biyofilm oluşumu sırasında zayıf biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi.

TSB-L besiyerinde *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonucunda 0.121 OD₅₇₀ absorbans değerinde bakteri yapışması belirlenirken 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise 0.559 OD₅₇₀ absorbans değerinde biyofilm oluşturduğu belirlendi. *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu genç biyofilm oluşumu esnasında zayıf biyofilm üreticisi olarak, olgun biyofilm oluşumu esnasında ise kuvvetli biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi.

TSB-L besiyeri içerisinde *Paenibacillus* sp. 32O-W suşunun yüzeye yapışma miktarında 24 saatlik inkübasyonundan 72 saatlik inkübasyon sonuna kadar yaklaşık 1.6 kat artış belirlendi. *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunun yüzeye yapışma miktarında ise 24 saatlik inkübasyonundan 72 saatlik inkübasyon sonuna kadar yaklaşık 4.61 kat artış bulundu. Her iki *Paenibacillus* suşunun TSB-L besiyerinde biyofilm oluşturma potansiyeli incelendiğinde inkübasyon süresi arttıkça yüzeye yapışan hücrelerin de arttığı gözlemlendi.

TSB-S besiyerinde *Paenibacillus* sp. 32O-W 24 saatlik inkübasyon sonucunda 0.425 OD₅₇₀ absorbans değerinde biyofilm oluştururken 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise 0.815 OD₅₇₀ absorbans değerinde biyofilm oluşturduğu belirlendi. Genç biyofilm oluşumu sırasında zayıf biyofilm üreticisi olarak değerlendirilirken olgun biyofilm oluşumu sırasında ise orta düzeyde biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi.

TSB-S besiyerinde *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonucunda 0.173 OD₅₇₀ absorbans değerinde bakteri yapışması belirlenirken 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise 0.522 OD₅₇₀ absorbans değerinde biyofilm oluşturduğu belirlendi. *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu genç biyofilm oluşumu esnasında biyofilm üreticisi değil olarak, olgun biyofilm oluşumu esnasında ise zayıf biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi.

TSB-S besiyeri içerisinde *Paenibacillus* sp. 32O-W suşunun yüzeye yapışma miktarında 24 saatlik inkübasyonundan 72 saatlik inkübasyon sonuna kadar yaklaşık 1.92 kat artış belirlendi. *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşunun yüzeye yapışma miktarında ise 24 saatlik inkübasyonundan 72 saatlik inkübasyon sonuna kadar yaklaşık 3.02 kat artış bulundu. Her iki *Paenibacillus* suşunun TSB-S besiyerinde biyofilm oluşturma potansiyeli incelendiğinde inkübasyon süresi arttıkça yüzeye yapışan hücrelerin de arttığı gözlemlendi.

İki farklı besiyeri (TSB-L ve TSB-S) ile yapılan biyofilm oluşum deneyleri sonucunda *Paenibacillus* suşlarının farklı besiyeri içerisinde farklı potansiyellerde biyofilm oluşturma eğiliminde olduğu gözlemlendi. TSB-L besiyeri içerisinde *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu, *Paenibacillus* sp. 32O-W suşuna göre daha fazla biyofilm oluşturma eğiliminde olduğu belirlendi. TSB-S besiyeri içerisinde ise *Paenibacillus* sp. 32O-W suşunun *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşuna göre daha fazla biyofilm oluşturma potansiyeli taşıdığı gözlemlendi. Süt proteinlerinin ortamda olması ile *Paenibacillus* suşlarındaki biyofilm oluşturma davranışının değiştiği belirlenmiştir. Spor oluşturan termofilik bakterilerin vejetatif hücrelerine kıyasla, sporlarının yüzeye bağlanma yeteneği daha fazla olmaktadır [Jindal and Anand, 2018; Flint et al., 2001]. Bu açıdan bakıldığında farklı besiyeri içerisinde *Paenibacillus* suşlarının spor oluşturma ve dolayısı ile farklı yüzeye bağlanma yeteneklerinin farklı olduğu düşünülmektedir. Hücre yüzey hidrofobikliği vejetatif hücre ve sporlar için farklı bağlanma potansiyelleri taşımaktadır [Jindal and Anand, 2018]. Hidrofobik olan polistren (PS) yüzeyde *Paenibacillus* suşlarının yüzeye bağlanmalarında farklılıklar

olmasının bir diğer nedeninin farklı besiyerleri içerisinde spor oluşturma yetenekleri olduğu düşünülmektedir.

Mevcut literatürde *Paenibacillus* sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşlarının biyofilm oluşturma potansiyellerine dair çalışma olmadığı için bu suşların biyofilm oluşturma potansiyelleri süt endüstrisinde sorunlara yol açan termofilik *Bacillus* genusuna suşlar ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldı.

Cihan ve arkadaşları (2017), *Bacillus* genusa ait çeşitli bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelini araştırmışlardır. Termofilik bakterilerin biyofilm oluşumunu, TSB besiyeri içerisinde 48-96 saatlik inkübasyon süresi, 55-65 °C inkübasyon sıcaklığı ile sağlamışlardır. Çalışma sonucunda, inkübasyon sıcaklığının ve süresinin artması ile termofilik bakteri biyofilmlerinde de anlamlı bir biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. Çalışma içerisinde süt endüstrisi için zararlı kabul edilen *Geobacillus* suşlarının biyofilmlerinde 55 °C inkübasyon sıcaklığında 0.1-0.2 OD₅₉₅ aralığında absorbans değerleri, 65 °C inkübasyon sıcaklığında 0.1-0.6 OD₅₉₅ aralığında absorbans değerleri ölçülmüştür. *Anoxybacillus* suşlarının biyofilmlerinde 55 °C inkübasyon sıcaklığında 0.1-0.2 OD₅₉₅ aralığında absorbans değerleri, 65 °C inkübasyon sıcaklığında 0.1-0.3 OD₅₉₅ aralığında absorbans değerleri ölçülmüştür. Yapılan çalışmada inkübasyon süresi arttıkça oluşan biyofilm miktarında da artış gözlemlenmiştir ve termofilik bakteri biyofilmlerinde bu durumun gerçekleşmesi bu tez çalışmasındaki *Paenibacillus* suşlarının biyofilm oluşumunu inkübasyon süresi arttıkça artmasını desteklemektedir.

Sadiq ve arkadaşlarının (2017b) yaptığı çalışmada, Çin süt tozundan izole ettikleri mezofilik ve termofilik bakterinin biyofilm oluşumlarını gözlemlenmiştir. Biyofilm oluşumu polistren plakada % 0.2 (w/v) çözünabilir patates nişastası ekledikleri TSB besiyerinde, termofilik bakteriler için 55 °C inkübasyon sıcaklığı ve 24 saat inkübasyon süresi ile biyofilm oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Paslanmaz çelik yüzeyde ise TSB veya süt ortamında biyofilm oluşunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, *Anoxybacillus* suşları biyofilmleri polistren yüzeyde yaklaşık 0.4 OD₅₇₀ absorbans değerinde ölçülürken, *Geobacillus* suşları 0.2-0.3 OD₅₇₀ absorbans değerinde ölçülmüştür. Süt içerisinde oluşturulan termofilik biyofilmler incelendiğinde *Anoxybacillus* suşları biyofilmleri yaklaşık 2.0-5.30 log CFU/cm² olarak, *Geobacillus* suşları biyofilmleri ise yaklaşık 3.0-5.20 log CFU/cm² olarak ölçülmüştür. Termofilik suşların biyofilm oluşturma kapasitesinin ortamda sütün var olması ile pozitif bağıntılı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen

sonuç ile bağlantılı olarak, *Paenibacillus* suşlarının süt içeren TSB besiyeri içerisinde (TSB-S) inkübe edilmesi bu suşların 24 ve 72 saat süren inkübasyon sürecinde daha hızlı çoğalmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Karaca ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada, *Anoxybacillus* and *Geobacillus* suşlarının biyofilmleri üzerinde yüzey metaryalinin, inkübasyon sıcaklığının (55 °C ve 65 °C) ve süt tipinin (yağlı, yarı yağlı, yağsız süt) etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda çoğu bakteri cam ve paslanmaz çelik yüzeyde 55 °C ve 65 °C sıcaklıklarda biyofilm oluşumu sağlamasına rağmen suşlara göre ideal yüzeyin polistren, polipropilen ve polivinil klorür olarak değiştiğini gözlemlemişlerdir. Inkübasyon sıcaklığı 55 °C'den 65 °C'ye çıkarıldığında *Anoxybacillus* suşlarının biyofilm oluşumunun polistren ve polipropilen yüzeyde artış eğiliminde olduğunu, *Geobacillus* suşlarında ise cam ve paslanmaz çelik yüzeyde artış eğiliminde olduğunu belirlemişlerdir. Süt tipinin biyofilm oluşumu üzerinde etkisini incelediklerinde ise *Anoxybacillus* suşlarının yağsız süt için risk faktörü olduğunu, *Geobacillus* suşlarının ise tam yağlı süt için risk faktörü olduğunu saptamışlardır. Karaca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan (2019) elde edilen sonuçlara göre termofilik basillerin biyofilm oluşturma eğilimleri yüzeye, besiyeri içeriğine, inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. *Paenibacillus* suşlarının TSB-L ve TSB- S besiyerindeki biyofilm oluşturma potansiyellerinin farklı olması literatürdeki sonuçları desteklemektedir. *Paenibacillus* suşlarının farklı yüzey, sıcaklık ve besiyeri ortamlarında biyofilm oluşumu incelendiğinde termofilik *Bacillus* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Paenibacillus sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşlarının TSB-S besiyerinde oluşan biyofilmlerinin ortadan kaldırılma (%) oranları 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda E2-M2 ekstraktı ve klor (200 ppm) solüsyonu uygulaması ile belirlendi.

Paenibacillus sp. 32O-W suşu biyofilminin 24 saatlik genç biyofilm oluşumu sonrasında yapılan uygulamalarda E2-M2 ekstraktı % 0 oranında oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığı, klor (200 ppm) ise % 73 oranında oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığı bulundu. 72 saatlik olgun biyofilm oluşumu sonrasında yapılan uygulamalarda ise E2-M2 ekstraktı % 0 oranında oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığı, klor (200 ppm) ise % 78 oranında oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığı belirlendi. Bulgular neticesinde, E2-M2 ekstraktının *Paenibacillus* sp. 32O-W suşu biyofilmlerine karşı etkisinin olmadığı saptandı. Kullanılan ekstrakt

konsantrasyonunun arttırılması ile veya ekstrakt uygulama süresinin uzatılması ile kuşburnu ekstraktının *Paenibacillus* sp. 32O-W suşu biyofilmlerine karşı antibiyofilm etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

P. naphthalenovorans 32O-Y suşu biyofilmlerinin 24 saatlik genç biyofilm oluşumu sonrasında yapılan uygulamalarda E2-M2 ekstraktı % 58 oranında oluşan bakteri yapışmasını ortadan kaldırdığı, klor (200 ppm) ise % 82 oranında oluşan bakteri yapışmasını ortadan kaldırdığı belirlendi. 72 saatlik olgun biyofilm oluşumu sonrasında yapılan uygulamalarda ise E2-M2 ekstraktı % 23 oranında oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığı, klor (200 ppm) ise % 73 oranında oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığı bulundu. Değerlendirme sonucunda, E2-M2 ekstraktının *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu üzerindeki antibiyofilm etkisinin süt içeren besiyeri içerisinde bakteri inkübasyon süresi arttıkça azaldığı belirlendi. Yapılacak antibiyofilm uygulamasının biyofilm oluşmadan veya erken biyofilm oluşumu aşamında yapılması biyofilmler ile mücadele etmede önem arz ettiği sonucuna varıldı. Kullanılan ekstrakt konsantrasyonunun arttırılması ile veya ekstrakt uygulama süresinin uzatılması ile kuşburnu ekstraktının *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu biyofilmlerine karşı antibiyofilm etkisinin artabileceği düşünülmektedir.

Albayrak'ın yaptığı tez çalışmasında (2018), *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* mikroorganizmalarının 48 saatlik inkübasyon sonucu oluşan biyofilmlerinin nar atıklarının doğal antibiyofilm etkisi ile ortadan kaldırılması çalışmasını gerçekleştirmiştir. Çalışmada nar atıklarından elde edilen ekstraktların *B. cereus* biyofilmini % 83 oranında ortadan kaldırdığı, *B. subtilis* biyofilmini ise % 67 oranında ortadan kaldırdığı belirlendi. Kalpar'ın yaptığı tez çalışmasında (2019), süt endüstrisi için sorun teşkil eden *Staphylococcus aureus*'un 48 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan biyofilmleri nar atıklarının doğal antibiyofilm etkisi ile ortadan kaldırılması çalışmasını gerçekleştirmiştir. Çalışmada kullanılan polistren yüzeyde süt içeren TSB besiyeri içerisinde biyofilmi oluşturulan *S. aureus* suşunun nar atığı ekstraktları ile muamelesi sonucunda % 42 oranında biyofilminin ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalara göre nar atığı ekstraktlarının farklı mikroorganizma biyofilmlerinin ortadan kaldırılmasında etkisinin çeşitli olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre biyoaktif madde açısından zengin nar ekstraktlarının farklı bakteriler üzerinde çeşitli etkinlikte olması, bu tez çalışmasındaki biyoaktif madde açısından zengin olan kuşburnu ekstraktının *Paenibacillus* suşları üzerinde farklı etki göstermesini desteklemektedir.

Hemmati ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2020), kuşburnu ekstraktlarından ZnO (çinko oksit) nanopartikülleri üretmişler ve *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerinin 24 saatlik biyofilm oluşumları üzerinde bu nanopartiküllerin antibiyofilm etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, *P. aeruginosa* kontrol grubu biyofilm oluşumu yaklaşık 2 OD₅₇₀ absorbans değerinde ölçülürken, nanopartikül ile mumamele edilmiş *P. aeruginosa* deney grubu biyofilmi yaklaşık 1.2 OD₅₇₀ absorbans değerinde ölçülmüştür. *S. aureus* kontrol grubu biyofilm oluşumu yaklaşık 3.8 OD₅₇₀ absorbans değerinde ölçülürken, *S. aureus* deney grubu biyofilmi yaklaşık 1.8 OD₅₇₀ absorbans değerinde ölçülmüştür. Kullanılan kuşburnu ekstraktı ile hazırlanan nanopartiküllerin *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilmleri üzerinde antibiyofilm etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da kuşburnu ekstraktının antibiyofilm etkisi ile süt endüstrisi için sorun teşkil eden bakterilere karşı etkili olduğu literatür tarafından desteklenmektedir.

Paenibacillus türleri süt, konserve gibi pastörize, soğutulmuş hazır yemeklerin bozulmasına neden olan mikroorganizmalardandır ve gıdaların yapısı, işleme koşulları ve depolama sıcaklığı, mikrobiyal gıda bozulmasını kontrol etmek için önemli faktörlerdir [Helmond et al., 2017]. Mevcut literatürde, *Paenibacillus* suşlarının süt endüstrisi içerisinde biyofilm oluşturma potansiyeli açısından kısıtlı literatür kaynağı olması ve bu çalışma *Paenibacillus* sp. 32O-W ve *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşlarına ait literatürdeki ilk biyofilm çalışması olduğu için bu tez çalışması literatürdeki *Paenibacillus* suşları biyofilmleri ve diğer termofilik bakteri biyofilmlerinin kontrol stratejilerine katkı sağlayacaktır.

Yapılan tez çalışmasında, kuşburnu meyvesinden farklı çözücü ve farklı yöntemler kullanılarak hazırlanan ekstraktların endüstriyel alanda kullanılma potansiyelinin araştırılması önem arz etmektedir. Elde edilen antibakteriyel etkili ekstraktlar gıda koruyucu, meyve-sebze suları, aromalı gıda gibi endüstriyel birçok alanda kullanılabilir. Ayrıca süt endüstrisinde kullanılan kimyasal antibiyofilm ajanlara alternatif olma potansiyeli taşımaktadır. Bu nedenle, çalışmalardan elde edilen sonuçlar termofilik bakteri biyofilmlerine karşı mücadelede literatüre katkı sağlayacaktır. Ayrıca, süt endüstrisinin yanı sıra tüm gıda sanayinde insan ve çevre sağlığını tehlikeye atan zararlı ajanlara alternatif olarak doğal antibakteriyel ajanların kullanımına teşvik edici olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz M. M., Emam T. M., Elsherbiny E. A., (2019), “Effects of mandarin (*Citrus reticulata*) peel essential oil as a natural antibiofilm agent against *Aspergillus niger* in onion bulbs”, *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110959.
- Abriouel H., Franz C. M., Omar N. B., Galvez A., (2011), “Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*”, *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232.
- Akbas M. Y., Cag S., (2016), “Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces”, *Food Science and Technology International*, 22(7), 587–597.
- Akbas M. Y., Kokumer T., (2015), “The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments”, *International Journal of Food Science and Technology*, 50(7), 1666–1672.
- Akbas M. Y., Ölmez H., (2007), “Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids”, *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 619–624.
- Albayrak C., (2018), “Meyve İşleme Sanayi Atığı Ekstraktlarındaki Doğal Antibiyofilim Ajanlarının Araştırılması”, *Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi*.
- Alkass J. E., Baker I. A., Saleh H. H., (2013), “Reduction of Oxidative Rancidity and Microbial Activities of the Karadi Lamb Patties in Freezing Storage Using Natural Antioxidant Extracts of Rosemary and Ginger”, *International Journal of Agricultural and Food Research*, 2(1), 31–42.
- Aourach M., V. González-de-Peredo A., Vázquez-Espinosa M., Essalmani H., Palma M. F., Barbero G., (2021), “Optimization and Comparison of Ultrasound and Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Cotton-Lavender (*Santolina chamaecyparissus* L.)”, *Agronomy*, 11(1), 84.
- Ash C, Farrow J. A., Wallbanks S., Collins M. D., (1991), “Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences”, *Letters in Applied Microbiology*, 13, 202–206.
- Ash Carol, Priest F. G., Collins M. D., (1993), “Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 253–260.
- Assaf D., Steinberg D., Shemesh M., (2014), “Lactose triggers biofilm formation by *Streptococcus mutans*”, *International Dairy Journal*, 42, 51–57.

Ayati Z., Amiri M. S., Ramezani M., Delshad E., Sahebkar A., Emami S. A., (2018), “Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review”, *Current Pharmaceutical Design*, 24(35), 4101–4124.

Ayhan D. K., (2016), “Süt İşletmelerinde Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşumunun Karakterizasyonu”, *Doktora Tezi*, Hacettepe Üniversitesi.

Bakkiyaraj D., Nandhini J. R., Malathy B., Pandian S. K., (2013), “The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens”, *Biofouling*, 29(8), 929–937.

Banerjee D., Shivapriya P. M., Gautam P. K., Misra K., Sahoo A. K., Samanta S. K., (2019), “A Review on Basic Biology of Bacterial Biofilm Infections and Their Treatments by Nanotechnology-Based Approaches”, *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 90(2), 243–259.

Beno S. M., Cheng R. A., Orsi R. H., Duncan D. R., Guo X., Kovac J., Carroll L. M., Martin N. H., Wiedmann M., (2020), “*Paenibacillus odorifer*, the Predominant *Paenibacillus* Species Isolated from Milk in the United States, Demonstrates Genetic and Phenotypic Conservation of Psychrotolerance but Clade-Associated Differences in Nitrogen Metabolic Pathways”, *MSphere*, 5(1), 1–16.

Borlee B. R., Goldman A. D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D. J., Parsek M. R., (2010), “*Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix”, *Molecular Microbiology*, 75(4), 827–842.

Butler R. R., Wang J., Stark B. C., Pombert J. F., (2016), “Complete genome sequences of two interactive moderate thermophiles, *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y and *Paenibacillus* sp. 32O-W”, *Genome Announcements*, 4(1), 4–5.

Cavalera M., Axling U., Rippe C., Swärd K., Holm C., (2017), “Dietary rose hip exerts antiatherosclerotic effects and increases nitric oxide-mediated dilation in ApoE-null mice”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 44, 52–59.

Chemat F., Rombaut N., Sicaire A. G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A. S., Abert-Vian M., (2017), “Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.

Chemat F., Vian M. A., Cravotto G., (2012), “Green extraction of natural products: Concept and principles”, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627.

Chrubasik-Hausmann S., Chrubasik C., Neumann E., Müller-Ladner U., (2014), “A pilot study on the effectiveness of a rose hip shell powder in patients suffering from chronic musculoskeletal pain”, *Phytotherapy Research*, 28(11), 1720–1726.

Cihan A. C., Karaca B., Ozel B. P., Kilic T., (2017), “Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to *Bacillaceae* family”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6).

Coruh S., Ercisli S., (2010), “Interactions between galling insects and plant total phenolic contents in *Rosa canina* L. genotypes”, Scientific Research and Essays, 5(14), 1935–1937.

Črnivec I. G. O., Muri P., Djinović P., Pintar A., (2014), “Biogas production from spent rose hips (*Rosa canina* L.): Fraction separation, organic loading and co-digestion with N-rich microbial biomass”, Bioresource technology, 171, 375–383.

Cunja V., Mikulic-Petkovsek M., Weber N., Jakopic J., Zupan A., Veberic R., Stampar F., Schmitzer V., (2016), “Fresh from the Ornamental Garden: Hips of Selected Rose Cultivars Rich in Phytonutrients”, Journal of Food Science, 81(2), C369–C379.

Da Silva P. M., Da Silva B. R., De Oliveira Silva J. N., De Moura M. C., Soares T., Feitosa A. P. S., Brayner F. A., Alves L. C., Paiva P. M. G., Damborg P., Ingmer H., Napoleão T. H., (2019), “*Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*” International Journal of Biological Macromolecules, 135, 931–939.

Daane L. L., Harjono I., Barns S. M., Launen L. A., Palleroni N. J., Häggblom M. M., (2002), “PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(1), 131–139.

Daels-Rakotoarison D. A., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Luyckx M., Dine T., Bailleul F., Cazin M., Cazin J. C., (2002), “Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst”, Phytotherapy Research, 16(2), 157–161.

Daneshmand P., Saliminejad K., Shasaltaneh M., Kamali K., Riazi G., Nazari R., Azimzadeh P., Khorshid H. R. K., (2016), “Neuroprotective effects of herbal extract (*Rosa canina*, *tanacetum vulgare* and *urtica dioica*) on rat model of sporadic alzheimer’s disease”, Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 8(3), 120–125.

De Kievit T. R., (2009), “Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, Environmental Microbiology, 11(2), 279–288.

De Vos P., Garrity G. M., (2009), “Berge’s Manual of Systematic Bacteriology”, International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2nd Edition, Volume 3, Springer.

Delaunay L., Cozien E., Gehannin P., Mouhali N., Mace S., Postollec F., Leguerinel I., Mathot A. G., (2021), “Occurrence and diversity of thermophilic sporeformers in French dairy powders”, International Dairy Journal, 113, 104889.

DeLeon S. D., Welliver R. C., (2016), “*Paenibacillus alvei* sepsis in a neonate”, Pediatric Infectious Disease Journal, 35(3), 358.

Demir N., Yildiz O., Alpaslan M., Hayaloglu A. A., (2014), “Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey”, *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 126–133.

Demir T., Ağaoğlu S., (2020), “Antimicrobial and Antioxidant Activity of Different Herbal Tea Combinations”, *Turkish Journal of Veterinary Research*, 4(2), 69–77.

Demirkol G., Ertürk Ö., (2019a), “Antimicrobial and Antioxidant Effects of Spice Extracts”, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(2), 305–313.

Demirkol G., Erturk O., (2019b), “Antibacterial and antifungal effects of acetone extracts from fifty spice and herb plants”, *Herba Polonica*, 65(3), 32–38.

Dervişoğlu M., Gül O., Yazıcı F., Aydemir O., (2013), “Süt ve Süt Ürünlerinde Organik Klorlu Pestisit Varlığı”, *Gıda ve Yem Bilimi-Teknoloji Dergisi*, 13, 31–40.

Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L. A., (2002), “Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation”, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950–2958.

Donlan R. M., (2002), “Biofilms: microbial life on surface”, *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.

Dorosh O., Moreira M. M., Rodrigues F., Peixoto A. F., Freire C., Morais S., Delerue-Matos C., (2020), “Vine-canes valorisation: Ultrasound-assisted extraction from lab to pilot scale”, *Molecules*, 25(7).

Dubtsova G. N., Negmatulloeva R. N., Bessonov V. V., Baïkov V. G., Sheviakova L. V., Makhova N. N., Perederiaev O. I., Bogachuk M. N., Baïgarin E. K., (2012), “Composition and content of biologically active substances in rose hips”, *Voprosy Pitaniia*, 81(6), 84–88.

Duval D., Galinier R., Mouahid G., Toulza E., Allienne J. F., Portela J., Calvayrac C., Rognon A., Arancibia N., Mitta G., Théron A., Gourbal B., (2015), “A Novel Bacterial Pathogen of *Biomphalaria glabrata*: A Potential Weapon for Schistosomiasis Control?”, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–21.

Ercisli S., (2007), “Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa spp.*) species”, *Food Chemistry*, 104(4), 1379–1384.

Erler S., Denner A., Bobiş O., Forsgren E., Moritz R. F. A., (2014), “Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*”, *Ecology and Evolution*, 4(20), 3960–3967.

Ersoy N., Bağcı Y., Zenginbal H., Ozen M. S., Elidemir A. Y., (2015), “Antioxidant Properties of Rosehip Fruit Types (*Rosa canina sp.*) Selected From Bolu-Turkey”, *International Journal of Science and Knowledge*, 4(1), 51–59.

Estrela A., Heck M., Abraham W.-R., (2009), “Novel Approaches to Control Biofilm Infections”, *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1512–1530.

- Fenglin H., Ruili L., Bao H., Liang M., (2004), “Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants”, *Fitoterapia*, 75(1), 14–23.
- Flemming H. C., Wingender J., (2010), “The biofilm matrix”, *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Flint S., Palmer J., Bloemen K., Brooks J., Crawford R., (2001), “The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel”, *Journal of Applied Microbiology*, 90, 151–157.
- Flint S., Bremer P., Brooks J., Palmer J., Sadiq F. A., Seale B., Teh K. H., Wu S., Md Zain S. N., (2020), “Bacterial fouling in dairy processing”, *International Dairy Journal*, 101, 104593.
- Fukuzaki S., (2006), “Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes”, *Biocontrol Science*, 11(4), 147–157.
- Ghendov-Moşanu A., Cojocari D., Balan G., Sturza R., (2018), “Antimicrobial Activity of Rose Hip and Hawthorn Powders on Pathogenic Bacteria”, *Journal of Engineering Science*, 25(4), 100–107.
- Gopal N., Hill C., Ross P. R., Beresford T. P., Fenelon M. A., Cotter P. D., (2015), “The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry”, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1418.
- Grady E. N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z. C., (2016), “Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review”, *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–18.
- Güler Ü. A., Can Ö. P., (2017), “Kimyasal Kontaminantların Çevre Sağlığı ve Gıda Güvenliği Üzerine Etkileri”, *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 170–195.
- Gün İ., Ekinci F. Y., (2009), “Biyofilmler :Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam”, *Gıda*, 34, 165–173.
- Güneş M., (2010), “Pomological and phenological characteristics of promising rose hip (*Rosa*) genotypes”, *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6301–6306.
- Gürbüz I., Üstün O., Yesilada E., Sezik E., Kutsal O., (2003), “Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey”, *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 93–97.
- Hammer B. K., Bassler B. L., (2003), “Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*”, *Molecular Microbiology*, 50(1), 101–104.
- Han Z., Zhang Z., Dong Y., Yang M., (2014), “Effects of endophytic bacteria P22 and S16 in populus on the rooting and growth of the relative species plants”, *Journal of Northeast Forestry University*, 42(7), 117–125.

Helmond M., Groot M. N. N., Van Bokhorst-Van De Veen, H., (2017), “Characterization of four *Paenibacillus* species isolated from pasteurized, chilled ready-to-eat meals”, *International Journal of Food Microbiology*, 252, 35-41.

Hemmati F., Salehi R., Ghotaslou R., Kafil H. S., Hasani A., Gholizadeh P., Rezaee M. A., (2020), “The assessment of antibiofilm activity of chitosan-zinc oxide-gentamicin nanocomposite on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2248–2258.

Heydorn A., Nielsen A. T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersboll B. K., Molin S., (2000), “Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT”, *Microbiology*, 146(10), 2395–2407.

Horváth G., Molnár P., Radó-Turcsi E., Deli J., Kawase M., Satoh K., Tanaka T., Tani S., Sakagami H., Gyémánt N., Molnár J., (2012), “Carotenoid composition and in vitro pharmacological activity of rose hips”, *Acta Biochimica Polonica*, 59(1), 129–132.

İlbay Z., Şahin S., İsmail Ş. K., (2013), “Investigation of polyphenolic content of rose hip (*Rosa canina* L.) tea extracts: A comparative study”, *Foods*, 2(1), 43–52.

Ince A. E., Şahin S., Şümnü S. G., (2013), “Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1), 69–75.

Ivanovs K., Blumberga D., (2017), “Extraction of fish oil using green extraction methods: A short review”, *Energy Procedia*, 128, 477–483.

Jemaa H., B., Jemia, A. B., Khelifi, S., Ahmed H. B., Slama F. B., Benzarti A., Elati J., Aouidet A., (2017), “Antioxidant Activity and α -Amylase Inhibitory Potential of *Rosa canina* L.”, *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 14(2), 1–8.

Jindal S., Anand S., (2018), “Comparison of adhesion characteristics of common dairy sporeformers and their spores on unmodified and modified stainless steel contact surfaces”, *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5799–5808.

Jindal S., Anand S., Huang K., Goddard J., Metzger L., Amamcharla J., (2016), “Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers”, *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9502–9513.

Jung S., Main D., (2014), “Genomics and bioinformatics resources for translational science in Rosaceae”, *Plant Biotechnology Reports*, 8(2), 49–64.

Kaderides K., Papaoikonomou L., Serafim M., Goula A. M., (2019), “Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction”, *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 137, 1–11.

Kalpar E., (2019), “Meyve Kabuğu Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Karaca B., (2018), “Farklı Çevresel Koşulların Süt Ürünleri Endüstrisinde Sorun Teşkil Eden *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* Biyofilmleri Üzerine Olan Etkilerinin ve Biyogiderim Mekanizmalarının Belirlenmesi”, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.

Karaca B., Buzrul S., Cihan, A. C., (2019), “*Anoxybacillus* and *Geobacillus* biofilms in the dairy industry: effects of surface material, incubation temperature and milk type”, *Biofouling*, 35(5), 551–560.

Karagözlü C., Karagözlü N., (2004), “Süt Endüstrisinde Deterjan ve Dezenfektan Kalıntılarının Önemi”, *HR. Ü. Z. F. Dergisi*, 8((3/4)), 73–81.

Kilic I. H., Sarikurkcu C., Karagoz I. D., Uren M. C., Kocak M. S., Cilkiz M., Tepe B., (2016), “A significant by-product of the industrial processing of pistachios: Shell skin - RP-HPLC analysis, and antioxidant and enzyme inhibitory activities of the methanol extracts of *Pistacia vera* L. shell skins cultivated in Gaziantep, Turkey”, *RSC Advances*, 6(2), 1203–1209.

Koczka N., Stefanovits-Bányai É., Ombódi A., (2018), “Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some *Rosa* Species”, *Medicines*, 5(3), 84.

Kökümer T., (2013), “İşlenmemiş Sütlerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Doğal Antimikrobiyallerle Engellenmesi ve Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Kökümer T., Akbas M. Y., (2016), “Malik Asit Uygulamalarının *S. aureus* Biyofilmleri Üzerinde Antibiyofilm Etkileri”, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 19(1), 37–42.

Kot B., Sytykiewicz H., Sprawka I., (2018), “Expression of the biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm and planktonic conditions”, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3487.

Kouidhi B., Al Qurashi Y. M. A., Chaieb K., (2015), “Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment”, *Microbial Pathogenesis*, 80, 39–49.

Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O., Horyuk Y., Semaniuk N., (2017a), “The Influence of Disinfectants on Microbial Biofilms of Dairy Equipment”, *EUREKA: Life Sciences*, 5, 11–17.

Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O., Horiuk Y., Semaniuk N. (2017b), “Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them”, *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 5/11(89), 26–33.

- Kumar M., Flint S. H., Palmer J., Plieger P. G., Waterland M., (2019), “The effect of phosphate on the heat resistance of spores of dairy isolates of *Geobacillus stearothermophilus*”, *International Journal of Food Microbiology*, 309, 108334.
- Lee J. S., Bae Y. M., Lee S. Y., Lee S. Y., (2015), “Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* on Various Surfaces and Their Resistance to Chlorine Sanitizer”, *Journal of Food Science*, 80(10), M2279–M2286.
- Liu N., Dopffel N., Hovland B., Alagic E., Vik B. F., Bødtker G., (2020), “High osmotic stress initiates expansion and detachment of *Thalassospira* sp. biofilms in glass microchannels”, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(6).
- Lu L., Hu W., Tian Z., Yuan D., Yi G., Zhou Y., Cheng Q., Zhu J., Li M., (2019), “Developing natural products as potential anti-biofilm agents”, *Chinese Medicine*, 14(1), 1–17.
- Ma Y., Ding S., Fei Y., Liu G., Jang H., Fang J., (2019), “Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*”, *Food Control*, 106, 106712.
- Martino E., Collina S., Rossi D., Bazzoni D., Gaggeri R., Bracco F., Azzolina O., (2008), “Influence of the extraction mode on the yield of hyperoside, vitexin and vitexin-2-O-rhamnoside from *Crataegus monogyna* Jacq. (Hawthorn)”, *Phytochemical Analysis*, 19(6), 534–540.
- Mason T. J., Chemat F., Vinatoru M., (2011), “The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves”, *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237–247.
- Medveckiene B., Kulaitiene J., Jariene E., Vaitkeviciene N., Hallman E., (2020), “Carotenoids, Polyphenols, and Ascorbic Acid in Organic Rosehips (*Rosa* spp.) Cultivated in Lithuania”, *Applied Sciences*, 10(15), 5337.
- Mihaylova D., Vrancheva R., Petkova N., Ognyanov M., Desseva I., Ivanov I., Popova M., Popova A., (2018), “Carotenoids, tocopherols, organic acids, carbohydrate and mineral content in different medicinal plant extracts”, *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 73(11–12), 439–448.
- Mishra R., Panda A. K., De Mandal S., Shakeel M., Bisht S. S., Khan J., (2020), “Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens”, *Frontiers in Microbiology*, 11, 2640
- Mohsenipour Z., Hassanshahian M., (2015), “The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria”, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(8).
- Mugadza D. T., Buys E., (2018), “*Bacillus* and *Paenibacillus* species associated with extended shelf life milk during processing and storage”, *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 301–308.

Murathan Z. T., Zarifikhosroshahi M., Kafkas E., Sevindik E., (2016), "Characterization of bioactive compounds in rosehip species from East Anatolia region of Turkey", Italian Journal of Food Science, 28(2), 314–325.

Nagatomo A., Nishida N., Fukuhara I., Noro A., Kozai Y., Sato H., Matsuura Y., (2015), "Daily intake of rosehip extract decreases abdominal visceral fat in preobese subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial", Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 8, 147–156.

Tiwari B. K., Norton T., Holden N. M., (2013), "Sustainable food processing", 1st Edition, John Wiley & Sons.

Nur N., (2010), "Knowledge and behaviours related to herbal remedies: A cross-sectional epidemiological study in adults in Middle Anatolia, Turkey", Health and Social Care in the Community, 18(4), 389–395.

Okan O. T., Serencam H., Baltas N., Can Z., (2019), "Some Edible Forest Fruits Their in Vitro Antioxidant Activities, Phenolic Compounds And Some Enzyme Inhibition Effects", Fresenius Environmental Bulletin, 28(8), 6090–6098.

Öksüztepe G., Demir P., (2019), "Süt İşletmelerinde Temizlik ve Dezenfeksiyon", Türkiye Klinikleri, 1, 195–200.

Olajide A. M., LaPointe G., (2020), "Detection of spore forming *Paenibacillus macerans* in raw milk", Journal of Microbiological Methods, 177, 106048.

Oprica L., Bucsa C., Zamfirache M. M., (2015), "Ascorbic acid content of rose hip fruit depending on altitude", Iranian Journal of Public Health, 44(1), 138–139.

Öz M., Baltacı C., Deniz İ., (2018), "Gümüşhane Yöresi Kuşburnu (*Rosa canina* L.) ve Siyah Kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.) Meyvelerinin C Vitamini ve Şeker Analizleri", Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8, 284–292.

Özrenk K., Gündoğdu M., Doğan A., (2012), "Erzincan Yöresi Kuşburnu (*Rosa canina* L.) Meyvelerinin Organik Asit, Şeker ve Mineral Madde İçerikleri", Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 22(1), 20–25.

Palmer J. S., Flint S. H., Schmid J., Brooks J. D., (2010), "The role of surface charge and hydrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 37(11), 1111–1119.

Panja P., (2018), "Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials", Current Opinion in Food Science, 23, 173–182.

Patel S., (2017), "Rose hip as an underutilized functional food: Evidence-based review", Trends in Food Science and Technology, 63, 29–38.

Paunović D., Kalušević A., Petrović T., Urošević T., Djinović D., Nedović V., Popović-Djordjević J., (2019), "Assessment of chemical and antioxidant properties of

fresh and dried rosehip (*Rosa canina* L.)”, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 108–113.

Phetcharat L., Wongsuphasawat K., Winther K., (2015), “The effectiveness of a standardized rose hip powder, containing seeds and shells of *Rosa canina*, on cell longevity, skin wrinkles, moisture, and elasticity”, *Clinical Interventions in Aging*, 10, 1849–1856.

Pitts B., Hamilton M. A., Zelter N., Stewart P. S., (2003), “A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal”, *Journal of Microbiological Methods*, 54(2), 269–276.

Polat R., Satil F., (2012), “An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey)”, *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 626–641.

Proksch E., (2018), “pH in nature, humans and skin”, *The Journal of dermatology*, 45(9), 1044–1052.

Pushparaj Selvadoss P., Nellore J., Balaraman Ravindran M., Sekar U., Tippabathani J., (2018), “Enhancement of antimicrobial activity by liposomal oleic acid-loaded antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*”, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(2), 268–273.

Ranieri M. L., Ivy R. A., Robert Mitchell W., Call E., Masiello S. N., Wiedmann M., Boor K. J., (2012), “Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products”, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5855–5863.

Rovná K., Ivanišová E., Žiarovská J., Ferus P., Terentjeva M., Kowalczewski P. Ł., Kačániová M., (2020), “Characterization of *Rosa canina* fruits collected in urban areas of Slovakia. Genome size, IPBS profiles and antioxidant and antimicrobial activities”, *Molecules*, 25(8).

Rovná K., Petrová J., Terentjeva M., Černá J., Kačániová M., (2015), “Antimicrobial Activity of *Rosa canina* Flowers Against Selected Microorganisms”, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(1), 62–64.

Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V., (2018), “Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action”, *Virulence*, 9(1), 522–554.

Sadeghi H., Hosseinzadeh S., Akbartabar Touri M., Ghavamzadeh M., Jafari Barmak M., Sayahi M., Sadeghi H., (2016), “Hepatoprotective effect of *Rosa canina* fruit extract against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat”, *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(2), 181–188.

Sadiq F. A., Flint S., Li Y., Liu T., Lei Y., Sakandar H. A., He G., (2017a), “New mechanistic insights into the motile-to-sessile switch in various bacteria with particular emphasis on *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*: a review”, *Biofouling*, 33(4), 306–326.

Sadiq F. A., Flint S., Yuan L., Li Y., Liu T. J., He G. Q., (2017b), “Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders”, *International Journal of Food Microbiology*, 262, 89–98.

Sar T., Akbas M. Y., (2019), “Glucose effect on biofilm formations of *S. aureus* strains”, *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 52–55.

Şar T., Akbaş M. Y., (2018), “*B. cereus* Biyofilmlerinin Sitrik Asit Uygulamaları ile Kontrolü”, *Gıda*, 43(4), 605–616.

Sar T., Chen Y., Bai Y., Liu B., Agarwal P., Stark B. C., Akbas M. Y., (2020), “Combining co-culturing of *Paenibacillus* strains and *Vitreoscilla* hemoglobin expression as a strategy to improve biodesulfurization”, *Letters in Applied Microbiology*, 72(4), 484-494.

Saxena N., Pore S., Arora P., Kapse N., Engineer A., Ranade D. R., Dhakephalkar P. K., (2015), “Cultivable bacterial flora of Indian oil reservoir: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential”, *Biologia*, 70(1), 1–10.

Scheldeman P., Goossens K., Rodriguez-Diaz M., Pil A., Goris J., Herman L., De Vos P., Logan N. A., Heyndrickx M., (2004), “*Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 885–891.

Schmidt R. H., (1996), “Basic Elements of Equipment Cleaning and Sanitizing in Food Processing and Handling Operations”, University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.

Scott S. A., Brooks J. D., Rakonjac J., Walker K. M. R., Flint S. H., (2007), “The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder”, *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 109–117.

Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L. K., Komagata K., (1997), “Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 289-298.

Simões M., Simões L. C., Vieira M. J., (2010), “A review of current and emergent biofilm control strategies”, *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.

Singh P., Basak G., Sharma B., Jain U., Mishra R., Vaishali V., (2019), “Biofilm- An Alarming Niche in Dairy Industry”, *International Journal of Livestock Research*, 9(4), 10–24.

Solano C., Echeverz M., Lasa I., (2014), “Biofilm dispersion and quorum sensing”, *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104.

Srey S., Jahid I. K., Ha S. D., (2013), "Biofilm formation in food industries: A food safety concern", *Food Control*, 31(2), 572–585.

Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Bonaventura G. D., Djukic S., Circovic I., Ruzicka F., (2007), "Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*", *Apmis*, 115(8), 891–899.

Szentmihályi K., Vinkler P., Lakatos B., Illés V., Then M., (2002), "Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods", *Bioresource Technology*, 82(2), 195–201.

Tahirović A., Bašić N., (2017), "Determination of phenolic content and antioxidant activity of *Rosa canina* L. fruits in different extraction systems", *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo*, 47(1), 57–49.

Tayefi-Nasrabadi H., Sadigh-Eteghad S., Aghdam Z., (2012), "The effects of the hydroalcohol extract of *Rosa canina* L. Fruit on experimentally nephrolithiasic wistar rats", *Phytotherapy Research*, 26(1), 78–85.

Teh K. H., Flint S., Bremer P., (2015), "Raw milk quality influenced by biofilms and the effect of biofilm growth on dairy product quality", *Biofilms in the Dairy Industry*, 65-98.

Tejero-Sariñena S., Barlow J., Costabile A., Gibson G. R., Rowland I., (2012), "In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids", *Anaerobe*, 18(5), 530–538.

Tiwari B. K., (2015), "Ultrasound: A clean, green extraction technology", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.

Tolker-Nielsen T., (2015), "Biofilm development", *Microbiology spectrum*, 3(2), 3-2.

Trmčić A., Martin N. H., Boor K. J., Wiedmann M., (2015), "A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage", *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5806–5817.

Ulusoy Ç., Müjdecı A., Gökay O., (2009), "The effect of herbal teas on the shear bond strength of orthodontic brackets", *European Journal of Orthodontics*, 31(4), 385–389.

Unlu A., Sar T., Seker G., Erman A. G., Kalpar E., Akbas M. Y., (2018), "Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains and their control by selected phytochemicals", *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 637–646.

Veggi P. C., Martinez J., Meireles M. A. A., (2012), "Fundamentals of microwave extraction", In *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds* (pp. 15-52), Springer, Boston, MA.

Verghese R., Mathew S., David A., (2017), “Antimicrobial activity of Vitamin C demonstrated on uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*” Journal of Current Research in Scientific Medicine, 3(2), 88.

Vinatoru M., Mason T. J., Calinescu I., (2017), “Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials”, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 97, 159–178.

Wang J., Davaadelger B., Salazar J. K., Butler R. R., Pombert J. F., Kilbane J. J., Stark B. C., (2015), “Isolation and characterization of an interactive culture of two *Paenibacillus* species with moderately thermophilic desulfurization ability”, Biotechnology Letters, 37(11), 2201–2211.

Wang Y., Liang Y., Cock I. E., (2020), “*Rosa canina* L. Fruit Extracts Inhibit the Growth of Bacterial Triggers of some Autoimmune Inflammatory Diseases and Potentiate the activity of Conventional Antibiotics”, Pharmacognosy Communications, 10(1), 7–17.

Willich S. N., Rossnagel K., Roll S., Wagner A., Mune O., Erlendson J., Kharazmi A., Sörensen H., Winther K., (2010), “Rose hip herbal remedy in patients with rheumatoid arthritis - a randomised controlled trial”, Phytomedicine, 17(2), 87–93.

Wingender J., Strathmann M., Rode A., Leis A., Flemming H. C., (2001), “Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*”, Methods in Enzymology, 336(1973), 302–314.

Wolfmeier H., Pletzer D., Mansour S. C., Hancock R. E. W., (2018), “New Perspectives in Biofilm Eradication”, ACS Infectious Diseases, 4(2), 93–106.

Zhao Y., Caspers M. P. M., Metselaar K. I., De Boer P., Roeselers G., Moezelaar R., Groot M. N., Montijn R. C., Abee T., Korta R., (2013), “Abiotic and Microbiotic Factors Controlling Biofilm Formation by Thermophilic Sporeformers”, Applied and Environmental Microbiology, 79(18), 5652–5660.

Zhou K., Yamagishi M., Osaki M., (2008), “*Paenibacillus* BRF-1 has biocontrol ability against *Phialophora gregata* disease and promotes soybean growth”, Soil Science and Plant Nutrition, 54(6), 870–875.

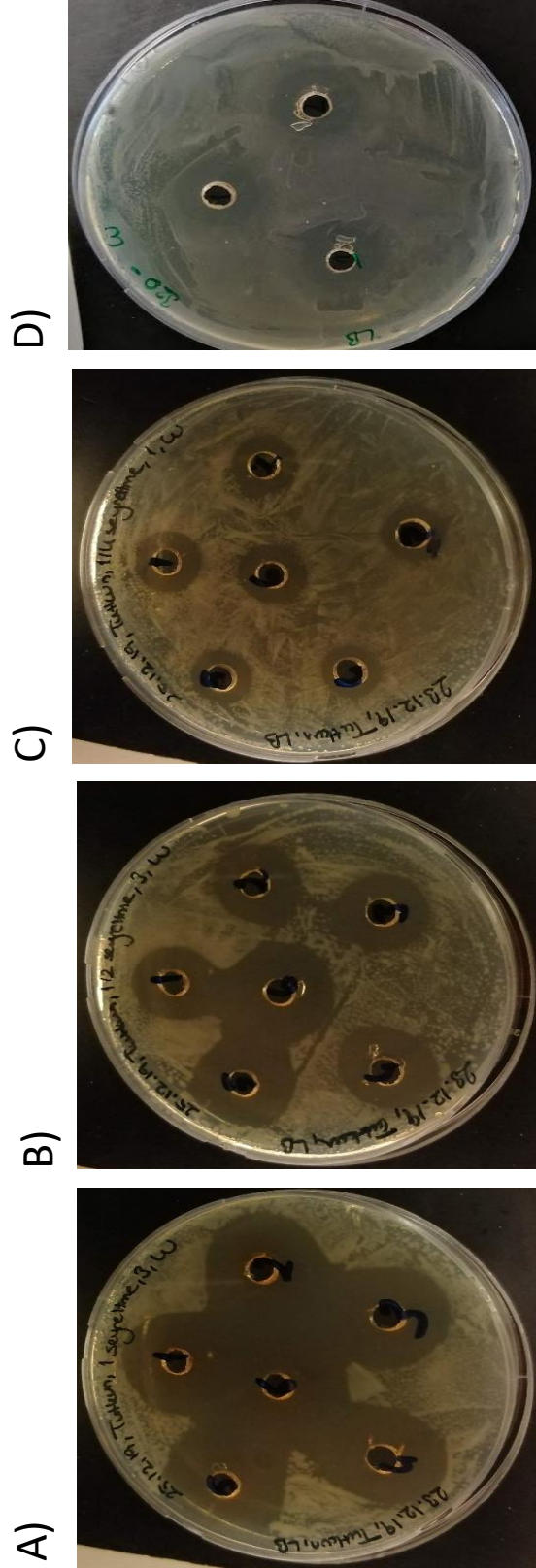
Živković J., Stojković D., Petrović J., Zdunić G., Glamočlija J., Soković M., (2016), “Correction: *Rosa canina* L. - New possibilities for an old medicinal herb. Food and Function”, 7(1), 610.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra TUTKUN 2013 yılında Darıca Neşet Yalçın Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2013 senesinde Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (% 30 İngilizce)'nde lisans eğitime başladı. 2018 senesinde Gebze Teknik Üniversitesi'nden başarıyla mezun oldu. 2018 senesinde lisansüstü eğitime başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde eğitime devam ediyor.

EKLER

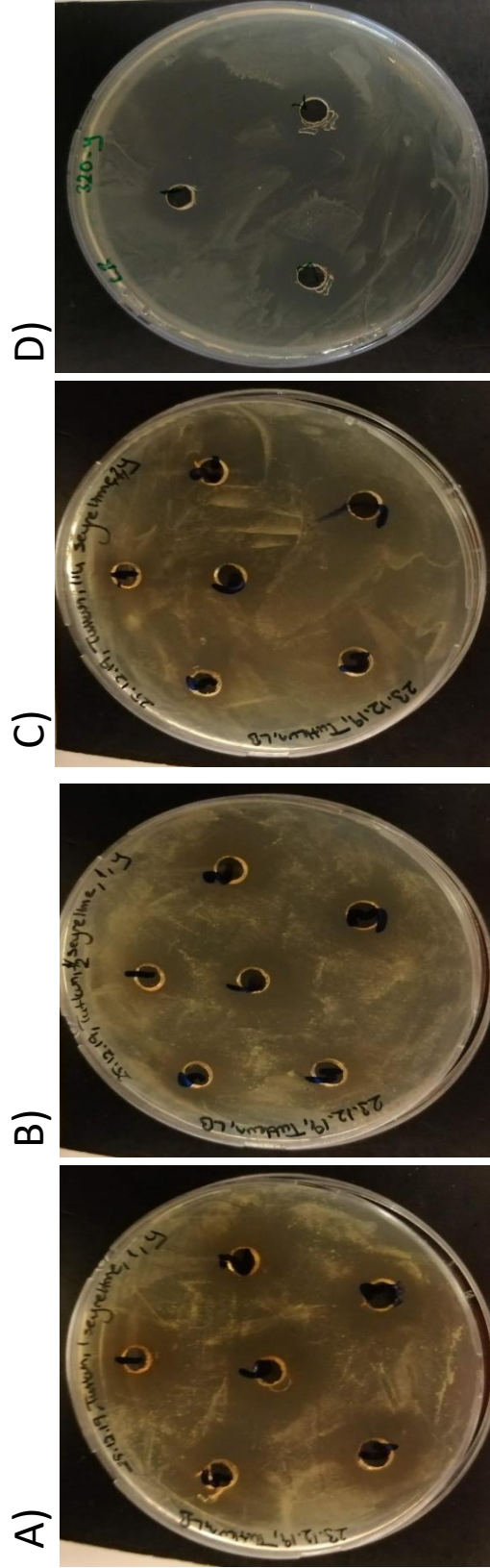
Ek A: Kuşburnu ekstraktlarının ve gentamisinin *Paenibacillus* sp. 32O-W suşu üzerindeki antimikrobiyal etkileri



Kuşburnu ekstraktlarının ve gentamisinin 32O-W suşu üzerindeki antimikrobiyal etkisi. A; 1/1 seyreltme oranındaki ekstraktların antimikrobiyal etkisi, B; 1/2 seyreltme oranındaki ekstraktların antimikrobiyal etkisi, C; 1/4 seyreltme oranındaki ekstraktların antimikrobiyal etkisi, D; gentamisin (10 µg/mL) antimikrobiyal etkisi.

Kuyular üzerindeki numaralar; 1: E1-M, 2: E2-M, 3: E3-M, 4: E1-U, 5: E2-U, 6: E3-U

Ek B: Kuşburnu ekstraktlarının ve gentamisinin *P. naphthalenovorans* 32O-Y suşu üzerindeki antimikrobiyal etkileri



Kuşburnu ekstraktlarının ve gentamisinin 32O-Y suşu üzerindeki antimikrobiyal etkisi. A; 1/1 seyreltme oranındaki ekstraktların antimikrobiyal etkisi, B; 1/2 seyreltme oranındaki ekstraktların antimikrobiyal etkisi, C; 1/4 seyreltme oranındaki ekstraktların antimikrobiyal etkisi, D; gentamisin (10 µg/mL) antimikrobiyal etkisi.

Kuvular üzerindeki numaralar: 1: E1-M. 2: E2-M. 3: E3-M. 4: E1-U. 5: E2-U. 6: E3-U