

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEYVE İŞLEME SANAYİ ATIĞI EKSTRAKTINDAKİ
DOĞAL ANTİBİYOFİLM AJANLARIN
ARAŞTIRILMASI

CANSEL ALBAYRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEYVE İŞLEME SANAYİ ATIĞI
EKSTRAKTINDAKİ DOĞAL ANTİBİYOFİLM
AJANLARIN ARAŞTIRILMASI

CANSEL ALBAYRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2018

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

**INVESTIGATION OF NATURAL
ANTIBIOFILM AGENTS IN INDUSTRIAL
FRUIT PROCESSING WASTE EXTRACTS**

CANSEL ALBAYRAK
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2018

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/06/2018 tarih ve 2018/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/06/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Cansel ALBAYRAK'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Bu çalışmada, meyve sanayi işleme yan ürünü olan nar (*Punica granatum* L.) atıklarının, *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkili biyoaktif bileşiklerin kaynağı olarak kullanılabilirliği araştırıldı. Bu kapsamda, nar atıklarından, farklı nar tozu/çözücü oranları (P1, 1:10 ve P2, 1:20; w/v), farklı sulandırma oranları (1:2-1:25) ve farklı çözücüler (etanol, metanol, etanol-asit, metanol-asit, aseton ve su; A-G) kullanılarak biyoaktif bileşiklerin (fenolik bileşik ve organik asit) en iyi ekstraksiyon koşulları belirlendi.

P2 metodu ile hazırlanan ekstraktların fenolik bileşik ve organik asit miktarları P1 metoduna göre hazırlanan ekstraktlara göre daha yüksek miktarda bulundu.

Her iki suş için de, en yüksek antibakteriyel etki, metanol ve asit kullanılarak hazırlanan (P1-E ve P2-E) ekstraktlar ile tespit edildi.

B. subtilis ve *B. cereus* suşlarının biyofilm oluşumlarının önlenmesi ve ortadan kaldırılmasında, nar atığı ekstraktlarının 1:5 sulandırma oranlarının (P2-5) etkili olduğu belirlendi. *B. subtilis* suşunun biyofilmlerinin, en fazla metanol-asit ile hazırlanan (P2-E) ekstraktının P2-5 oranı ile %80 oranında önlediği ve etanol ile hazırlanan (P2-A) ekstraktın P2-10 oranı ile %67 oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi. *B. cereus* suşunun biyofilmlerinin ise en fazla etanol-asit ile hazırlanan ekstraktın (P2-D) P2-5 oranı ile %79 oranında önlediği ve %83 oranında ortadan kaldırdığı belirlendi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, nar atığı ekstraktlarının doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olarak endüstride kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Nar atığı, doğal antibakteriyel ajan, doğal antibiyofilm ajanı, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, biyofilm kontrolü.

SUMMARY

In this work, the use of pomegranate (*Punica granatum* L.) wastes generated from fruit processing industry was investigated as a potential source of bioactive antibacterial and antibiofilm agents on *B. subtilis* and *B. cereus* strains. For this, the best extraction conditions for phenolic compounds and organic acids from pomegranate wastes were determined by using different waste powder/solvent ratios (P1, 1:10 and P2, 1:20; w/v), different dilution ratios (1:2-1:25) of extracts and different solvents (ethanol, methanol, ethanol-acid, methanol-acid, acetone and water; A-G).

The amount of phenolic compounds and organic acids were higher in extract P2 than P1.

The highest antibacterial activities on both *B. subtilis* and *B. cereus* strains were determined with the methanol-acid extracts (P-E and P2-E).

Biofilms of *B. subtilis* and *B. cereus* were prevented and removed effectively by the extracts diluted at 1:5 ratio. The highest ratio for prevention and removal of *B. subtilis* biofilms were about 80% by methanol-acid extracts (P2-E) and 67% by ethanol extract (P2-A), respectively. Moreover, *B. cereus* biofilms were prevented and removed with ethanol-acid extract (P2-D) by up to 79 % and 83%, respectively.

The results from this study showed that pomegranate extracts could be used as natural antibacterial and antibiofilm agents in industry.

Key words: Pomegranate, natural antibacterial agent, natural antibiofilm agent, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, biofilm control.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgmeden her daim motive ederek, bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan çok değerli danışmanım Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a,

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz, bu çalışma üzerinde emeği çok olan Merve BALABAN'a, bilgi ve tecrübelerini benimle her zaman paylaşan Taner ŞAR'a, yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Gamze ŞEKER ve Araş. Gör. Elif KALPAR'a,

Tez çalışmamda cihazlarını kullanmamıza olanak sağlayan Kimya bölümünden Prof. Dr. Devrim ATILLA, Dr. Öğr. Üyesi İrem KULU ve cihazların kullanımında yardımcı olan laboratuvar çalışma ekiplerine,

Laboratuvarını kullanmamıza olanak sağlayan kimya bölümünden Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN ve yardımlarını esirgemeyen Fatma ERTAN'a, tez çalışmamın önemli bir aşaması olan liyofilizasyon işleminin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Kimya Mühendisliği'nden Araş. Gör. Ebubekir Sıddık AYDIN'a,

Meyve atıklarını özenli bir şekilde bize temin eden Tropical vitamin bar işletmesine,

Göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili ailem Esat ALBAYRAK, Sevgi ALBAYRAK ve Caner ALBAYRAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Bacillus</i> Suşlarının Karakteristik Özellikleri	3
2.1.1. <i>Bacillus subtilis</i> 'in Karakteristik Özellikleri	4
2.1.2. <i>Bacillus cereus</i> 'un Karakteristik Özellikleri	4
2.1.3. Biyofilm ve Yapısı	6
2.1.4. Biyofilm Oluşumu	6
2.1.5. Gıda Endüstrisinde <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Suşlarının Oluşturdukları Biyofilmlerin Önemi	8
2.2. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Genel Dezenfeksiyon İşlemleri	10
2.2.1. Biyoaktif Bileşiklerin Gıda Endüstrisinde Dezenfektan Olarak Kullanımı	11
2.3. Nar	14
2.3.1. Nar Atıklarının Ülkemizdeki ve Dünyadaki Kullanım Alanları	15
2.3.2. Nar Atıklarının Özellikleri	15
2.3.3. Nar Atıklarından Biyoaktif Bileşik Eldesi	17
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	19
3.1. GEREÇLER	19
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	19
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	20
3.2. YÖNTEMLER	20

3.2.1. Nar Atıklarının Hazırlanması	20
3.2.2. Ekstraksiyon	21
3.2.2.1. Farklı Çözücüler ile Ekstraksiyon Metotları	23
3.2.3. Farklı Metotlar ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının Sulandırma Oranları	23
3.2.4 Fenolik Bileşiklerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Belirlenmesi	26
3.2.5. Fenolik Bileşik, Organik Asit ve Şeker Miktarlarının Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi	27
3.2.6. Kültür Ortamlarının Hazırlanması	28
3.2.7. Standart Agar Kuyu Difüzyonu	29
3.2.8. Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması	29
3.2.8.1. Biyofilm Oluşturma Kapasitesi	29
3.2.8.2. Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi	30
3.2.8.3. Biyofilm Oluşumunun Ortadan Kaldırılması	31
3.2.9. İstatiksel Analiz	31
4. BULGULAR	33
4.1. Farklı Metotlar ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının İçeriklerinin Belirlenmesi	33
4.2. Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının <i>B. subtilis</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi	37
4.2.1. P1 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının <i>B. subtilis</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	37
4.2.2. P2 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının <i>B. subtilis</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	39
4.2.3. P1 ve P2 Metotları ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının Sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) Kullanımlarının <i>B. subtilis</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	41
4.3. Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının <i>B. cereus</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi	41
4.3.1. P1 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının <i>B. cereus</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	42
4.3.2. P2 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının <i>B. cereus</i> Suşu	43

Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	
4.3.3. P1 ve P2 Metotları ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının Sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) Kullanımlarının <i>B. cereus</i> Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	45
4.4. <i>B. subtilis</i> ve <i>B. cereus</i> Suşlarının Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri	46
4.5. <i>B. subtilis</i> Suşunun Biyofilm Oluşumunun Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktları ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması	46
4.5.1. <i>B. subtilis</i> suşunun Biyofilm Oluşumunun P2 Ekstraktı ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması	47
4.6. <i>B. cereus</i> Suşunun Biyofilm Oluşumunun Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktları ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması	49
4.6.1. <i>B. cereus</i> suşunun Biyofilm Oluşumunun P2 Ekstraktı ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması	49
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kısaltmalar

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikro litre
µm	: Mikro metre
A	: Etanol ve 120 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
B	: Etanol ve 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
BF	: Biyofilm oluşan kuyulardaki ortalama absorbans değeri
Bl	: Kör
C	: Metanol ve 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
Cl ₂	: Klor
cv	: Kültivar
D	: Etanol-asit ve 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
DE	: Ekstrakt
Ds	: Distile su
E	: Metanol-asit ve 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
EPS	: Ekzopolisakkarit
EtAs	: Etil asetat
EtOH	: Etanol
F	: Aseton ve 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
FA	: Formik asit
FeCl ₃	: Ferrik klorür
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
G	: Su ve 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan ekstrakt
GA	: Glasiyel asetik asit
g	: Gram
gL ⁻¹	: Gram/litre
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HCl	: Hidroklorik asit
HOCl	: Hipoklorik asit
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
I ₂	: İyot

K	: Klor solüsyonu
kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MP	: Yürütücü Faz
MP1	: Yürütücü faz 1 (EtAs: FA: Ds, 10:2:3)
MP2	: Yürütücü faz 2 (EtAs: GA: Ds, 10:2:3)
MP3	: Yürütücü faz 3 (EtAs: GA: FA: Ds, 100:11:11:26)
MP4	: Yürütücü faz 4 (EtAs: GA: FA: Ds, 100:11:11:10)
MP5	: Yürütücü faz 5 (EtAs: GA: FA: Ds, 100:11:11:5)
MP6	: Yürütücü faz 6 (EtAs: GA: FA, 100:11:11)
MP7	: Yürütücü faz 7 (TOL: EtAs: FA: MeOH, 3:3:0.8:0.2)
MP8	: Yürütücü faz 8 (EtAs: MeOH: Ds, 81:11:8)
nm	: Nanometre
P1	: 1:10 (w/v) oranında nar atığı tozu ve çözücünün kullanıldığı metot
P1-1	: Direkt P1 ekstraktı (sulandırılmamış hali)
P1-2	: 1:2 oranında sulandırılan P1 ekstraktı
P1-5	: 1:5 oranında sulandırılan P1 ekstraktı
P1-10	: 1:10 oranında sulandırılan P1 ekstraktı
P1-25	: 1:25 oranında sulandırılan P1 ekstraktı
P1-50	: 1:50 oranında sulandırılan P1 ekstraktı
P1-A	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında etanol ve 120 dakika ekstraksiyon ile hazırlanan P1 ekstraktı
P1-B	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında etanol ve 30 dakika ekstraksiyon ile hazırlanan P1 ekstraktı
P1-C	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında metanol ve 30 dakika ekstraksiyon ile hazırlanan P1 ekstraktı
P1-D	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında etanol-HCl ile hazırlanan P1

	ekstraktı
P1-E	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında metanol-HCl ile hazırlanan P1 ekstraktı
P1-F	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında aseton ile hazırlanan P1 ekstraktı
P1-G	: 1:10 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında su ile hazırlanan P1 ekstraktı
P2	: 1:20 (w/v) oranında nar atığı tozu ve çözücünün kullanıldığı metot
P2-1	: Direkt P2 ekstraktı (sulandırılmamış hali)
P2-2	: 1:2 oranında sulandırılan P2 ekstraktı
P2-5	: 1:5 oranında sulandırılan P2 ekstraktı
P2-10	: 1:10 oranında sulandırılan P2 ekstraktı
P2-25	: 1:25 oranında sulandırılan P2 ekstraktı
P2-50	: 1:50 oranında sulandırılmış P2 ekstraktı
P2-A	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında etanol ve 120 dakika ekstraksiyon ile hazırlanan P2 ekstraktı
P2-B	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında etanol ve 30 dakika ekstraksiyon ile hazırlanan P2 ekstraktı
P2-C	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında metanol ile hazırlanan P2 ekstraktı
P2-D	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında etanol-HCl ile hazırlanan P2 ekstraktı
P2-E	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında metanol-HCl ile hazırlanan P2 ekstraktı
P2-F	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında aseton ile hazırlanan P2 ekstraktı
P2-G	: 1:20 w/v (nar atığı tozu: çözücü) oranında su ile hazırlanan P2 ekstraktı
Pa	: Pascal
PDA	: Photodiode array
ppm	: Milyonda bir birim
RID	: Refraktif Index Dedektörü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

T	: Nar atığı ekstraktlarının uygulandığı kuyulardaki ortalama absorbans değeri
THM	: Trihalometanları
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TOL	: Toluen
TSB	: Triptik Soy Broth
TSB _G	: %2 glukoz içeren Triptik Soy Broth
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Nar atığı tozu ile hazırlanan ekstraktların eldesi için uygulanan işlem basamakları.	25
4.1: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri punikalajin miktarları (%).	34
4.2 Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri elajik asit miktarları (%).	34
4.3: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri malik asit miktarları (%).	35
4.4: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri sitrik asit miktarları (%).	36
4.5: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri toplam şeker miktarları (%).	36
4.6: P1 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P1-1, P1-2, P1-5, P1-10, P1-25) <i>B. subtilis</i> suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri.	39
4.7: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-1, P2-2, P2-5, P2-10, P2-25) <i>B. subtilis</i> suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri.	40
4.8: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan farklı nar atığı ekstraktlarının sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) kullanımlarının <i>B. subtilis</i> suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri.	41
4.9: P1 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P1-1, P1-2, P1-5, P1-10, P1-25) <i>B. cereus</i> suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri.	43
4.10: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-1, P2-2, P2-5, P2-10, P2-25) <i>B. cereus</i> suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri.	45
4.11: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan farklı nar atığı ekstraktlarının sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) kullanımlarının <i>B. cereus</i> suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri.	46
4.12: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı	48

	sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10) <i>B. subtilis</i> suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi üzerindeki etkisi (%).	
4.13:	P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10) <i>B. subtilis</i> suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması üzerindeki etkisi (%).	48
4.14:	P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10) <i>B. cereus</i> suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi üzerindeki etkisi (%).	50
4.15:	P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10) <i>B. cereus</i> suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması üzerindeki etkisi (%).	51

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.2: Farklı dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etkileri.	13
3.1: Farklı oranlarda nar atığı tozu (P1 ve P2) ile farklı çözücüler (EtOH: etanol, MeOH: metanol, HCl: Hidroklorik asit, aseton, Ds: distile su) kullanılarak elde edilen farklı ekstraktlar (A-G).	22
3.2: Farklı oranlarda nar atığı tozu içeren metotlar (P1 ve P2) ve farklı çözücüler (A-G) kullanılarak hazırlanan ekstraktlar ile sulandırma oranları (EtOH: etanol, MeOH: metanol, HCl: Hidroklorik asit, Ds: distile su, DE: Ekstrakt).	24
3.3: Nar atığı tozları ile hazırlanan farklı ekstraktlarda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan farklı TLC yürütücü fazları. (EtAs: Etil asetat, GA: glasiyel asetik asit, FA: formik asit, TOL: toluen, Ds: distile su).	26
4.1: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan ekstraktların (A-G) pH değerleri.	37
5.1: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasından (A-G) en yüksek miktarda fenolik bileşik ve organik asit içeren nar atığı ekstraktları.	54
5.2: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) kullanılarak hazırlanan nar atığı ekstraktlarının <i>B. subtilis</i> ve <i>B. cereus</i> suşları üzerindeki belirlenen en yüksek antibakteriyel etkileri (mm).	54
5.3: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının <i>B. subtilis</i> ve <i>B. cereus</i> suşları üzerindeki belirlenen en yüksek antibiyofilm etkileri (%).	56
5.4: Punikalajin, elajik asit, sitrik asit ve malik asitin çeşitli çalışmalarda belirlenen antibiyofilm etkileri.	59

1. GİRİŞ

Biyofimler, farklı ortam koşullarında bakteriler tarafından kolaylıkla oluşturulan kompleks yapılardır. Biyofilm oluşumu için mikroorganizmanın kendisi ve bir substrat en temel gereksinimdir [Garrett et al., 2008]. Biyofimler, bir yüzeye tutunarak ürettikleri ekzopolisakkarit yapı içerisinde gömülü halde yaşayan mikroorganizma topluluklarıdır. Bu yapılar, tek bir mikroorganizma türünü veya çeşitli mikroorganizmaları içerebilirler.

Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında patojen ve/veya spor üreten formlarının bulunması sağlık açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Gıda endüstrisinde oluşan mikrobiyal biyofimler, tutundukları ekipmanların yüzeylerinde hasarlara, enerji kayıplarına, hatta mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonlara ve gıda zehirlenmelerine sebep olabilmektedir [Gün ve Ekinci, 2009]. Gıda patojenleri arasında *B. subtilis* ve *B. cereus*; sebep oldukları zehirlenme vakaları, enfeksiyonlar ve biyofilm oluşturabilmeleri nedeni ile ciddi sorunlara yol açan oldukça önemli mikroorganizmalardır [Lindsay et al., 2005].

Günümüzde, gıda endüstrisinde, biyofilm kontrolünde kullanılan klor gibi kimyasalların birçoğu insan sağlığını tehlikeye atan toksik kalıntılar bırakmakta ve ürünlerin kalitesini düşürmektedir. Bundan dolayı, sağlığa zararı olmayan, maliyeti düşük, doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanlara karşı duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu kapsamda, meyve sanayi işleme atıklarından olan nar atıkları hem içerdikleri fenolik bileşik, organik asit gibi biyoaktif bileşiklerden hem de kolay, bol miktarda ve maliyetsiz elde edilebilirliklerinden dolayı umut vericidir.

Meyve sanayi endüstrisinden elde edilen bu atıkların sadece bir miktarı yem ve boya maddesi eldesi gibi amaçlarla kullanılmakta geri kalan büyük bir kısmı ise doğrudan doğaya salınarak çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında, meyve atıklarının içerdikleri zengin biyoaktif bileşikler sayesinde, meyvenin gıda olarak tüketilebilen kısımlarına göre daha yüksek katma değere sahip olduğu ortaya konmuştur [Yaman, 2012]. Buna dayanarak, bu tez çalışmasında, nar atıklarından uygun ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların, gıda zehirlenmesine sebep olan önemli mikroorganizmalardan *B. subtilis* ve *B. cereus* suşlarının biyofilm oluşumlarının kontrolünde doğal bir antibiyofilm ajanı olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Gıda sektörlerinde en çok kullanılan kimyasal dezenfektanlar toksik kalıntılar bırakabilmekte ve ürün kalitesini etkilemektedir. Kullanılan çeşitli kimyasal dezenfektanların yerine doğal, düşük maliyetli, çevre dostu dezenfektanlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında, meyve sanayi işleme atığı olan nar atıklarından elde edilen ekstraktların antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Türkiye’de, meyve suyu eldesinde ve taze ürünler marketinde en çok tercih edilen nar çeşitleri arasında yer alan Hicaznar çeşidinin, çokça kullanımından dolayı fazla miktarda atık oluşmaktadır. Bu nar çeşidinin, fenolik bileşik ve organik asit gibi biyoaktif bileşik içeriklerinin ve doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olma potansiyellerinin belirlenmesi önemli bir araştırma konusudur. Ayrıca, literatürde nar ekstraktlarının mikroorganizmaların üremesini engelleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir [Bakkiyaraj et al., 2013]. Ancak gıda endüstrisinde sorun yaratan *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde farklı nar atığı ekstraktlarının antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması üzerine bilinen güncel bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle, bu tez çalışmasında, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve fazla miktarda işleme sonrası atık oluşturan nar meyvesinin atık kısımlarından biyoaktif bileşiklerin eldesi için endüstriyel kullanımlara uygun ekstrakt metotlarının belirlenmesi ve elde edilen ekstraktların doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olarak kullanımının sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Bacillus* Suşlarının Karakteristik Özellikleri

Bacillaceae familyasına ait olan *Bacillus* cinsi bakteriler, endospor oluşturan, doğada özellikle toprakta bulunan, Gram pozitif, çoğunlukla zorunlu aerob veya fakültatif anaerob olabilen ve genellikle hareketli bakterilerdir. *Bacillus* suşları, yuvarlak veya kare uçlu, ikili veya filamentler halinde, hücrede tek endospor içeren çubuk şeklindeki bakterilerdir.

Çoğunlukla mezofilik özellik gösteren *Bacillus* suşları; termofilik, asidofilik veya psikrotrof özellikler de gösterebilmektedir [Kalkan ve Halkman, 2006]. *Bacillus*'ların üremeleri için en uygun koşulların genellikle 30-37 °C arasında olduğu bilinmektedir. *Bacillus* suşlarının birçoğu glukoz, amonyum fosfat ve bazı mineral tuzları içeren solüsyonlarda üremeye oldukça elverişliiyken, bazı türlerin de ek olarak büyüme faktörleri, amino asitler veya daha kompleks besinsel desteklere ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir [Gordon et al., 1973].

Bazı *Bacillus* suşları; amilaz, lipaz, kitinaz, ksilanaz, pektinaz, proteaz ve selüloz gibi farklı ekstrasellüler enzimleri üretme potansiyelleri sayesinde gıda, ilaç, deterjan üretimi gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır [Katı vd., 2016].

Bacillus suşlarının hepsi patojen değildir. *Bacillus*'ların patojen olanları arasında en önemlisi şarbon hastalığına sebep olan *Bacillus anthracis*'tir [Thwaite and Atkins, 2012]. *B. cereus*, *B. subtilis* ve nadiren diğer *Bacillus* suşları gibi fırsatçı patojenlerin yaralarda, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış veya yanık tedavisi gören hastalarda bulunduğu belirtilmektedir [Thwaite and Atkins, 2012].

Bacillus suşlarının bazıları, gıdalarda bozulmaya ve gıda zehirlenmelerine sebep olmalarından dolayı oldukça önemlidir. Gıda zehirlenmelerine sebep olanlar arasında ise *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilis* ve *B. licheniformis* örnek olarak verilebilmektedir. *Bacillus*'ların sporları ısıya karşı dirençlidir. *Bacillus*'lar, katalaz ve asit üretirler ama gaz oluşturmazlar [Kalaylı ve Beyatlı, 2003]. Gıda bozulmalarına sebep olan *Bacillus* suşları arasında ise konserve ürünlerde bozulmaya sebep olan *B. coagulans* örnek olarak verilebilir.

2.1.1. *Bacillus subtilis*'in Karakteristik Özellikleri

B. subtilis, Gram pozitif bakteriler arasında en iyi karakterize edilen bakterilerden birisidir. *B. subtilis*, toprakta yaşayan bir mikroorganizma olarak bilinir ve çoğunlukla bitki köklerinde bulunur [Lopez and Mielich-Süss, 2015]. Ayrıca gübrede, hayvanlarda, süt ve su başta olmak üzere çeşitli gıdalarda da bulunabilmektedir [Kalaylı ve Beyatlı, 2003].

B. subtilis, sadece gerekli tuzları, karbon, azot ve fosfor kaynaklarını içeren minimal ortamda üreyebilmektedir [Piggot, 2009]. *B. subtilis*, besin kısıtlaması gibi zorlu koşullar ile karşılaştığında kendini korumaya almak için antibiyotik ve ekstrasellüler enzimlerin üretimi, hareketlilik ve biyofilm oluşumu gibi bir dizi tepkiler gerçekleştirir [Piggot, 2009]. Spor oluşumu, çevresel stres koşullarında oluşan en önemli bakteri savunmasıdır [Lopez et al., 2009].

B. subtilis, farklılaşma özelliğine sahip olan bakteriler arasında bilinen bir örnektir ve çok sayıda farklı hücre formuna sahiptir [Lopez et al., 2009]. *B. subtilis*, durgunluk fazında vejetatif hücrelere veya dış etkenlere oldukça dirençli sporlara farklılaşabilir. *B. subtilis*'in farklılaştığı diğer bir hücre tipi ise biyofilm oluşumu sırasında hücreleri bir arada tutan ekstrasellüler matriks materyali üreten hücre tipidir [Vlamakis et al., 2008]. Sıcaklık açısından genellikle mezofilik, üremelerinin ihtiyaç duydukları pH değerlerine göre nütrofiliktirler ancak çoğu zaman yüksek pH seviyelerine toleranslıdır [Fritze, 2004].

B. subtilis'ten antibiyotik üretiminde yararlanılabilmesi gibi olumlu yanları olmasına rağmen bu suşun birçok zararlı etkilerinin de olduğu bilinmektedirler. Bu zararları arasında gıdalara bulaşarak ürünlerin bozulmasına ve gıda zehirlenmelerine sebep olmalarının yanı sıra saprofit özellikte olan bu bakterinin direkt olarak doku ile teması özellikle gözle teması sonucunda panoftalmi, iridoksilit gibi göz yangılarına sebep olabildiği de rapor edilmiştir [Kalaylı ve Beyatlı, 2003].

2.1.2. *Bacillus cereus*'un Karakteristik Özellikleri

B. cereus; Gram pozitif, spor oluşturan, hareketli, aerobik veya fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. Gıda kontaminasyonlarına yol açan bu bakteri, gıda zehirlenmelerine ve enfeksiyonlara sebep olmaktadır [Liu et al., 2007], [Wang et al., 2015]. *B. cereus*'un ısıya dirençli sporları, gıdaların işlenmesi ve

korunması süreçlerinde hayatta kalarak sağlık açısından büyük tehlike oluşturmaktadır [Wang et al., 2015]. Bu patojen, genellikle gıda kaynaklı hastalıklarda teşhis edilir, ancak endoftalmi, menenjit veya periodontit vakalarında da rastlanmaktadır [Houry et al., 2010].

B. cereus'un optimum üreme sıcaklığı genellikle 30°C'dir [Kalkan ve Halkman, 2006]. Bazı *B. cereus* suşları düşük sıcaklıkta üreyebilme kabiliyetine sahiptir [Ulteea and Smida, 2001]. Bu türün üreme sıcaklıklarının minimum olarak 4-5°C'ye kadar düştüğü, maksimum olarak da 50°C'ye kadar çıkabildiği belirtilmektedir [Kalkan ve Halkman, 2006]. *B. cereus*; ısıya, kimyasal muamelelere ve radyasyona (UV, X-ışınları gibi) dirençlidir [Soni et al., 2016]. Ayrıca *B. cereus*; lesitinaz, jelatinaz, proteaz, amilaz aktivitesine sahip olup, nitratı indirgeyebilmekte ve polimiksine direnç göstermektedir [Kalkan ve Halkman, 2006].

Genellikle toprakta bulunan *B. cereus*; tahıllar, sebzeler, pirinç, yumurta akı, süt, et, pudingler, soslar gibi gıdalarda bulunmaktadır [Granum, 1997], [Ulteea and Smida, 2001], [Soni et al., 2016]. *Cereus* adını tahıl anlamındaki cereal'dan alır [Kalkan ve Halkman, 2006]. *B. cereus*'un, diyaretik ve emetik (kusturucu) olmak üzere iki farklı toksinden kaynaklanan gıda kökenli hastalıklara sebep olduğu belirtilmektedir [Granum and Lund, 1997], [Ulteea and Smida, 2001], [Soni et al., 2016]. Gıda zehirlenmesinin diyaretik türü, ince bağırsakta *B. cereus*'un vejetatif gelişimi sırasında üretilen kompleks enterotoksinlerden kaynaklanırken; emetik türü, gıdalardaki üreyen hücreler tarafından üretilen toksinlerden kaynaklanmaktadır [Granum and Lund, 1997]. Gıda zehirlenmelerine sebep olan önemli bir bakteri olmasına rağmen, *B. cereus*'un kusma tipi sendromu *S. aureus* intoksikasyonu ile, diyare tipi sendromu ise *C. perfringens* gıda zehirlenmeleri ile benzer semptomları göstermesinden dolayı zehirlenme vakalarında etiyolojik ajan olarak göz ardı edilmektedir [Granum and Lund, 1997], [Kalkan ve Halkman, 2006], [Çöl ve Aksu, 2017]. *B. cereus*'un hastalığa sebep olması için gereken toplam dozun 5×10^4 ile 5×10^{11} kob/g (veya kob/ml) arasında olması gerektiği ve bir gıdada 10^3 kob/g'den daha fazla *B. cereus* bulunuyor ise tüketim için güvenli sayılamayacağı belirtilmektedir [Granum and Lund, 1997]. *B. cereus*, çeşitli enfeksiyonlara da sebep olmaktadır. Bu enfeksiyonlara örnek olarak göz, yara, merkezi sinir sistemi ve solunum bölgesi enfeksiyonları ile kalp iç zarı enfeksiyonu belirtilmektedir [Marley ve Saini 1995], [Şenel ve Başoğlu, 2002].

2.1.3. Biyofilm ve Yapısı

Biyofilm matriksinin ana bileşeni olan ekzopolisakkaritler (EPS), biyofilmlerdeki toplam organik karbonun %50-90'ını oluşturur [Flemming et al., 2000], [Simões, 2013]. EPS'ler, bir hücrenin bir substrata veya başka bir hücreye bağlanmasından sorumludur [Characklis and Wilderer, 1989], [Garrett et al., 2008]. EPS'ler, mikroorganizmaların yüzeye hem dönüşümsüz olarak tutunmasını sağlamakta hem de biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmaları UV radyasyonuna, farklı pH koşullarına, osmotik basınca, su kaybına, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı korumaktadır [Gün ve Ekinci, 2009]. Ayrıca, biyofilm tabakasının içerdiği mikrokolonilerin altında ve arasında bulunan su ve besin maddelerinin akışını sağlayan su kanalları bulunmaktadır [Gün ve Ekinci, 2009], [Knetsch and Koole, 2011]. Bu su kanalları, besin maddeleri ve metabolitlerin alışverişini sağlayarak besin elverişliliğinin artırılmasını sağlamasının yanı sıra, toksik metabolitlerin giderimini sağlamakla görevlidir [Costerton et al., 1995].

Biyofilm yapısının oluşumunda; içerdiği mikroorganizmalar, çevresel koşullar, besin konsantrasyonu, pH, oksijen ve yüzeyin (dokusu veya pürüzlülüğü ve hidrofobikliği gibi) sahip olduğu özellikler oldukça önemlidir [Donlan, 2002].

Serbest halde bulunan mikroorganizmaların kullanılan dezenfektanlara veya antibiyotiklere karşı biyofilm içerisinde bulunduklarından daha hassas oldukları bilinmektedir. Hatta, patojen mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin, planktonik formda olanlara oranla antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli oldukları belirtilmektedir [Stewart and Costerton 2001], [Hoiby et al. 2010].

Olgun bir biyofilmin yapısında, hareketli hücreler komünitenin genişlemesine katkıda bulunmak amacıyla biyofilm tabakasının en alt katmanında bulunurken, ekstrasellüler matriksi oluşturan hücreler merkezde yer almaktadır [Vlamakis et al., 2008].

2.1.4. Biyofilm Oluşumu

Biyofilmler, tek bir tür mikroorganizmadan oluşabileceği gibi çeşitli mikrobiyal türlerden de oluşabilir [Davey and O'toole, 2000]. Biyofilm oluşturan bakteriler yüzeylerde alan ve besin için rekabet ederler veya işbirliği yapmak için

etkileşime girerler. Farklı bakteri türleri arasındaki etkileşimin sağlanması için; quorum sensing (yeterli çoğunluğu algılama), quorum quenching, antibakteriyeller veya siderofor gibi ikincil metabolitlerin salgılanması gibi gelişmiş hücreden hücreye iletişim mekanizmalarının aktivasyonu gerekmektedir [Davies et al.,1998], [Dong et al., 2001], [Dong and Zhang, 2005], [Lopez et al., 2009].

Biyofilm oluşumu; fiziksel, kimyasal ve biyolojik bir dizi sürecin sağlanması ile gerçekleşmektedir. Fletcher (1979)'e göre biyofilm oluşumu 3 basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar sırasıyla; mikroorganizmaların yüzeye tutunması veya yüzeyde birikmesi, organizma ve yüzey arasındaki etkileşim, yüzey üzerinde kolonileşme veya organizmaların büyümesi ve bölünmesi ile gerçekleşmektedir. Daha sonraki çalışmalarda; Characklis and Marshal (1990) tarafından biyofilm oluşumunun; yüzeyin algılanması, mikroorganizmanın dönüşümlü ve dönüşümsüz tutunması ve son olarak kolonizasyonun sağlanması için olgun biyofilmden hücrelerin ayrılması basamakları ile gerçekleştiği belirtilmiştir.

Biyofilm oluşum basamakları sırasıyla; dönüşümlü tutunma, geri dönüşümsüz tutunma, koloni gelişimi, biyofilm olgunlaşması ve biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması şeklinde de belirtilmektedir [Srey et al., 2012].

Biyofilm oluşumunun dönüşümlü tutunma evresinde, organik ve/veya inorganik maddelerin yüzeye yapışmasının ardından mikroorganizmaların yüzeye ilk tutunmasında, mikroorganizma yüzey ile direkt olarak temas etmemekte ancak yüzey ile mikroorganizma arasında çekici ve itici güçler (Van der Waals, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler) meydana gelmektedir [Akan ve Kınık, 2014]. Bu evre için; tutunulacak yüzeyin özellikleri, sıcaklık, pH, sıvı ortamın akış hızı, bakterinin yüzeye temas süresi, yüzeyin hidrofobikliği ve besin alımının miktarı önemli faktörlerdir [Baumgartner et al., 2007]. Bu evrede, durulama ile hücreler ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilmektedir [Akan ve Kınık, 2014].

Dönüşümsüz tutunma evresinde, mikroorganizmalar ve yüzey arasında kısa mesafeli etkileşimler gerçekleşmektedir [Akan ve Kınık, 2014]. Kısa/orta mesafeli etkileşimler arasında hidrofobik etkileşimler, hidrofobik basınç, sterik kuvvetler, Born itme kuvvetleri ve polimer köprüler bulunmaktadır [Freter et al., 1984], [Oliveira, 1992], [Simões, 2013]. Yüzeylere dönüşümsüz olarak tutunma işleminde; hücre yüzeyinin hidrofobik olması, fimbria ve flagella varlığı ve EPS üretimi gibi faktörler önemlidir [Donlan, 2002]. Tutunma işlemi gerçekleştikten sonra mikroorganizmalar fenotipik olarak farklı, fakat genetik olarak aynı hücrelerin alt

popölasyonlarına farklılaşabilmektedir [Lopez and Mielich-Süss, 2015]. Bu evrede, yüzeyin fizikokimyasal özellikleri de önemli bir faktördür.

Koloni gelişimi evresinde, yüzeye tutunmuş bakteriler bölünüp çoğalarak büyümeye başlar. Mikrokoloniler oluşur ve biyofilm matriksinin yapımına başlanır. Mikrokolonilerin oluşumunda ekzopolisakkaritlerin sentezlenmesi önemli bir faktördür.

Biyofilmin olgunlaşması evresinde ise, mikroorganizmaları stres faktörlerinden koruyan EPS üretimi gerçekleşmektedir [Simões, 2013]. Olgun bir biyofilmin yapısı; mikrobiyal bileşime, EPS üretimine, besin mevcudiyetine, hidrodinamik koşullara ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [Simões, 2013]. Olgun bir biyofilmde, bakterilerin ayrılması, planktonik bakterilerin eklenmesi, büyüme ve ölüm gibi birçok olay aynı anda belirli bir denge içerisinde gerçekleşebilmektedir [Simões, 2013]. Bu aşama ile biyofilm, kendi yoğunluğunu arttırmaya çalışarak en yüksek kalınlığa ulaşır. Biyofilm matriksinin içerdiği mikrokoloniler, farklı boyutlarda kule veya mantar şeklinde yapılar oluştururlar ve bu yapılar arasında besin taşınımını ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan ve su kanallarından oluşan bir dolaşım sistemi bulunmaktadır [Akan ve Kınık, 2014], [Hepdeniz ve Seçkin, 2017].

Biyofilm oluşumunun son evresi olan hücrelerin koparak ayrılması aşamasında ise, biyofilmler ortamdan ayrılarak yayılmaktadır.

Biyofilm oluşumunda, yüzeyin fizikokimyasal özellikleri, tutunma aşamasında önemli bir faktördür. Mikroorganizmalar; teflon, plastik gibi hidrofobik ve apolar özelliklere sahip yüzeylere, cam ve metal gibi hidrofilik özellik gösteren yüzeylere göre daha hızlı tutunabildiği belirtilmektedir [Fletcher and Loeb, 1979], [Pringle and Fletcher, 1983], [Bendinger et al., 1993].

2.1.5. Gıda Endüstrisinde *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Suşlarının Oluşturdukları Biyofilmlerin Önemi

Gıda endüstrisinde, gıdalarla temas halinde olan yüzeylere yetersiz dezenfeksiyon uygulanmalarından dolayı gıda kaynaklı hastalıklar ciddi oranda yayılabilmektedir [Chmielewski and Frank, 2003]. Biyofilmler, gıda endüstrisinde birçok soruna yol açmaktadır. Bu sorunların başlıcaları, biyofilmlerin yüzeylerde ısı

akışını engellemesi, yüzeylerin sürtünme direncini ve korozyon hızını arttırması ile ciddi enerji ve üretim kayıplarına sebep olmalarıdır [Garrett et al., 2008].

Gıda endüstrisinde oluşan biyofilmlerin, planktonik hücrelere göre daha zor giderilmesi, antibakteriyel ve dezenfektan ajanlara karşı dirençli hale gelmesi, ürün ve personel için tekrarlayan bir kontaminasyon kaynağı olması nedenleriyle ciddi sorunlara yol açmaktadır [Kumari and Sarkar, 2016]. Biyofilmlerin sebep olduğu diğer sorunlar ise; tıkalı borular boyunca azalan akış, tesislerin kullanılabilme sürelerinin azalmasına sebep olmaları, paslanmaz çeliğin korozyonu ve ısı transferinin engellenmesi örnek olarak verilebilir [Kumari and Sarkar, 2016].

Başta süt ve mezbaha endüstrileri olmak üzere, gıda endüstrisinde biyofilm oluşumu içerisinde bulunan patojen mikroorganizmalar çapraz kontaminasyona sebep olabilmektedir. Gıdalarla temas eden yüzeylerde temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri etkin bir şekilde sağlanamadığında ve mikroorganizmalar uzaklaştırılmadığında biyofilmler oluşabilmekte ve bu da biyotransfer riskini arttırmaktadır [Garrett et al., 2008].

Bacillus suşlarının biyofilmleri gıda endüstrisinde önemli kirleticilerdir. Süt işleme ekipmanı yüzeyleri üzerindeki *Bacillus* biyofilmleri, bozulmaya sebep olmaları ve enterotoksin üretmelerinden dolayı süt endüstrileri için oldukça önemlidir [Lindsay et al., 2005]. *B. cereus*'un, ticari bir süt fabrikasında yüzeylerde oluşan bir biyofilm tabakasının %12.4'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir [Sharma and Anand, 2002]. *Bacillus*'ların gıda işleme ekipmanı yüzeyleri üzerindeki biyofilmlerinin, özellikle antibakteriyellere dirençli olan endosporları içerdiği zaman, önemli sorunlara yol açtıkları bilinmektedir [Lindsay et al., 2005]. Ayrıca, *Bacillus*'ların sporları, stres koşullarına karşı oldukça dirençlidir ve hidrofobik özellik gösterirler. Bu özellikleri onların gıda işleme ekipmanlarına kolayca yapışmasını sağlamaktadır [Lindsay et al., 2005].

B. cereus, özellikle gıda işleme tesislerinde yaygın olarak kullanılan paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumuna sebep olmaktadır [Karunakaran and Biggs, 2011]. *B. cereus*'un paslanmaz çeliğin yüzeyine yapışması, sıcaklık, pH ve sürenin artmasıyla birlikte artış gösterdiği belirtilmiştir [Pena et al., 2014]. *B. cereus* biyofilmleri daha çok su içerisindeki bir sisteme kıyasla hava-sıvı ara yüzünde gelişmektedir [Wijman et al., 2007]. Bu durum, *B. cereus* biyofilmlerinin, özellikle üretim sırasında kısmen doldurulan veya bir üretim döngüsünden sonra artık sıvının kaldığı endüstriyel depolama ve borulama

sistemlerinde gelişebileceğini göstermektedir [Kumari and Sarkar, 2016]. Süt işleme hatlarında ve soğutma tanklarında pastörizasyon sonrası *B. cereus* biyofilmlerinin oluşumu, soğutma tanklarının iç yüzeylerinde tekrarlanan kontaminasyonlara ve bunun sonucunda tanka toplanan taze sütlerin bozulmasına yol açabilmektedir [Kumari and Sarkar, 2016].

B. subtilis de hava-sıvı ara yüzünde biyofilmler oluşturmaktadır [Morikawa, 2006]. Buna ek olarak, bazı *B. subtilis* suşları, fırıncılık endüstrisinde önemli bozulmalara ve ekonomik kayıplara neden olan bakterilerdir [Lindsay et al., 2006]. Vejetatif *B. subtilis* hücrelerinin var olan bir biyofilmi, besin sınırlaması koşullarına maruz kaldığında uyarılarak spor oluşturabilmektedir. Ayrıca, gıda işleme ekipmanı yüzeylerinin temizlenme aralıklarının genişlemesi ve daha uzun çalışma süreleri, *Bacillus* biyofilmlerinin ve sporlarının gıdayla temas eden yüzeyler üzerinde gelişmesine olanak sağlayabilmektedir [Lindsay et al., 2005].

2.2. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Genel Dezenfeksiyon İşlemleri

Gıda hijyeni, sağlık açısından oldukça önemli olduğundan bu hijyenin sağlanabilmesi için “çiftlikten çatala” kadar her aşamada uygun koşulların sağlanması gereklidir. Bu hijyen koşullarını sağlayabilmek için temizlik ve ardından dezenfeksiyon işlemi gerçekleştirilmelidir. Bu işlemlerin amacı, mikroorganizmaların tolere edilebilecek düzeye düşürülmesi ile bu mikroorganizmaların son ürünlere ve ekipmanlara kontaminasyonunun kontrol altına alınmasıdır. Temizlik aşamasında, kir veya gıda artıklarının alet ve ekipmanlardan uzaklaştırılması sağlanır ve hemen ardından gelen dezenfeksiyon aşaması ile de ortamda bulunan kontaminasyon kaynağı mikroorganizmaların uzaklaştırılması için uygulanır [Başkaya vd., 2009].

Günümüzde, dezenfeksiyon işlemlerinde büyük sorunlara yol açan biyofilm oluşumunun önlenmesi ve ortadan kaldırılması için etkili ve ucuz doğal ajan arayışları giderek artmaktadır. Gıda endüstrisinde, planktonik olarak bulunan mikroorganizmalardan daha çok, tek bir mikroorganizma türünden veya çeşitli mikroorganizmalardan oluşan biyofilmler çok daha ciddi tehlike oluşturmaktadır [Güvensen ve Ekmekcioğlu, 2016]. Biyofilm oluşumunun tamamen engellenmesi henüz mümkün değil iken bu oluşumun düzenli temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri

ile önlenmesi ve ortadan kaldırılması için çeşitli dezenfeksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Biyofilm kontrolünde uygulanan ısıt işlemler, kimyasal kullanımı ve radyasyon gibi işlemler en çok kullanılan yöntemler arasındadır. Bu işlemlere ek olarak yüksek basınçlı temizleme sistemleri, enzimler, elektrik alan gibi yöntemler de kullanılmaktadır [Akan ve Kınık, 2014].

Gıda endüstrisinde en çok tercih edilen kimyasalların başında klor gelmektedir [Schmidt, 2012]. Gıda endüstrisinde kullanılan klor içerikli dezenfektanların başlıcaları hipokloritler, inorganik kloraminler ve klordioksittir [Şenel ve Başoğlu, 2002]. Hipoklorik asit (HOCl), klor tabanlı dezenfektanların en aktif formunu oluşturmaktadır [Schmidt, 2012]. Kullanılan klorlu bileşikler gibi kimyasallar uygulama sonrası iyice durulanmadığında toksik kalıntılar bırakmakta ve gıdaların işlenmesi sırasında gıdalara bulaşarak uzun vadede insan sağlığı ve çevre açısından tehlike oluşturmaktadır. Klorlu bileşiklerin dezenfektan olarak kullanılmasının olumsuz etkileri arasında, metaller için aşındırıcı olmaları, plastikler ile reaksiyona girmeleri, organik maddeler ile geniş ölçüde bileşikler oluşturarak kendi etkilerini azaltmaları ve kanserojen trihalometanları (THM) oluşturmaları sayılabilmektedir [Schmidt, 2012]. Gıda endüstrisinde, klor uygulamasının işlem sonrası durulama yapılmayacağı durumlarda kullanılması uygun görülen en yüksek konsantrasyon olarak 200 ppm'e müsaade edilmektedir [Schmidt, 2012].

Gıda endüstrisinde, kullanılan farklı dezenfektanların mikroorganizmalar üzerindeki etkisi Tablo 1.1'de belirtilmiştir [Dornseiffen, 1998 ve Başkaya vd., 2009'dan değiştirilerek kullanılmıştır].

2.2.1. Biyoaktif Bileşiklerin Gıda Endüstrisinde Dezenfektan Olarak Kullanımı

Mikroorganizmaların biyofilm oluşumlarının engellenebilmesi için öncelikle gıda endüstrisinde kullanılan alet ve ekipmanlar ile biyofilm oluşturan mikroorganizmaların temasının kesilmesi gerekmektedir [Baskaya vd., 2009]. Bunun için de etkili dezenfektan kullanımı gerekmektedir.

Kimyasal katkı maddelerinin kullanımı tüketiciler tarafından bir sağlık riski olarak algılandığından, gıda endüstrisinin, gıda stabilitesini ve patojenlere karşı güvenliği iyileştirmek için doğal antibakteriyellerin kullanımı konusuna ilgi giderek

artmaktadır [Taguri et al., 2004], [Santas et al., 2010], [Cetin-Karaca and Newman, 2015].

Gıda endüstrisinde kullanılan dezenfektanlar; düşük maliyetli, etkili, güvenli ve kolay uygulanabilir, yüzeylerde toksik kalıntı bırakmayan, kolayca durulanabilir ve son ürünün duyuşal değęerlerini etkilemeyecek özelliklere sahip olmalıdır [Simões et al., 2010], [Var vd., 2015]. Bunlara ek olarak, dezenfektanların alet ve ekipmanlara korozyona sebep olmayacak, personel sağılığını tehlikeye sokmayacak ve gıda ortamında ağır koku içermeyecek özellikte olması tercih edilmektedir [Buliski et al., 1988], [Başkaya vd., 2009].

Güvenilir ve doğal dezenfektanlar arasında olabilecek biyoaktif bileşikler (fenolik bileşikler ve organik asitler gibi), gıda endüstrisinde doğal dezenfektanlar olarak kullanılabilirler [McDonnell and Russell, 1999]. Bu biyoaktif bileşiklerin kaynakları, çeşitli sebze ve meyveler [Yıldız ve Baysal, 2013] ile bunların kabukları veya çekirdeklerdir [Lu and Yuan, 2008], [Türkyılmaz et al., 2017].

Yapılan çalışmalarda, biyoaktif bileşiklerin *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *B. megaterium* ve *C. albicans* gibi mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel ve/veya antibiyofilm etkileri olduğu belirlenmiştir [Panichayupakaranant et al., 2010], [Bakkiyaraj et al., 2013], [Türkyılmaz et al., 2017].

Tablo 1.1: Farklı dezenfektanların farklı mikroorganizmalar üzerine etkileri.

Mikroorganizma	Asitler	Alkoller	Aldehitler	Alkaliler	Halojenler		Oksitleyici maddeler	Fenolik bileşikler	Kuaternar Amonyum bileşikleri		
					Cl ₂	I ₂					
Mikoplazma	++	++	++	++	++	++	++	++	++		
Gram (+) bakteriler	++	++	++	+	++	++	++	++	++		
Gram (-) bakteriler	++	++	++	+	++	+	+	++	+		
Riketsiyalar	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-		
Zarflı virüsler	+	+	++	+	++	+	+	+-	+-		
Klamidya	+-	+-	+	+	+	+	+	+-	-		
Fungal sporlar	+-	+-	+	+	+	+	+-	+-	+-		
Zarfsız virüsler	+-	-	+	+-	+	+-	+-	-	-		
Aside dirençli bakteriler	-	+	+	+-	+	+	+-	+-	-		
Bakteri sporları	+-	-	+	+-	+	+	+	-	-		
++:	Kuvvetli	derecede	etkili,	+	Etkili,	+/-:	Orta	derecede	etkili,	-:	Etkisiz

2.3. Nar

Punicaceae familyasına ait olan ve “meyvelerin kralı” olarak bilinen nar (*Punica granatum* L.) meyvesi bilinen en eski meyvelerden biridir [Kelebek ve Canbaş, 2010], [Oğuz vd., 2011], [Singh et al, 2014]. Nar bitkisi tropikal ve subtropikal iklimlerin bitkisi olmakla beraber geniş adaptasyon kabiliyetinden dolayı geniş üretim alanına sahiptir [Yaman vd., 2015], [İkinci ve Kılıç, 2016], [Şimşek ve İkinci, 2017]. Çalı ya da küçük ağaç şeklinde yetişen nar, Akdeniz ikliminin karakteristik bitkisi olmasından dolayı ülkemizde de bolca yetişebilen bir bitkidir [Gundogdu and Yilmaz, 2012], [Kurt ve Şahin, 2013], [Singh, 2014]. Narın anavatanları arasında İran, Türkiye’nin güney-güneydoğusu, Ortadoğu, Kafkasya ve Hindistan’ın kuzeyi sayılabilmektedir [Stover and Mercure, 2007], [Lye, 2008], [Ünal, 2011], [Kurt ve Şahin, 2013]. Türkiye, nar yetiştiriciliğine uygun iklim koşullarına sahip olmasından dolayı hemen hemen her bölgesinde nar yetiştiriciliği yapabilmektedir [Temiz ve Özgüven, 2010]. Ülkemiz, nar yetiştiriciliğinde dünya ülkeleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır [Sarica, 2011]. 2000’li yıllardan itibaren nar yetiştiriciliğinde ülkemizin meyve sektöründe gerçekleştirdiği yatırımlar ve gelişmeler sayesinde artış gözlemlenmektedir [Kurt ve Şahin, 2013]. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın sunduğu verilere göre, 2017 yılında, 502.606 ton nar üretimi gerçekleştirmiştir [TUIK, 2017a]. Narın 2016-2017 yıllarında ülkemizdeki tüketim miktarı da 284.052 ton olarak belirlenmiştir [TUIK, 2017b]. Narın sağlık üzerindeki faydaları hakkında bilincin artmasından dolayı kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve buna paralel olarak da toplam ağırlığı %48’i kabuktan, yaklaşık %11’i çekirdekten oluşan narın atık miktarı da artmaktadır [Sarica, 2011], [Zarei ve ark., 2011]. Meyve suyu işleme sanayinde fazla miktarlarda nar yan ürünleri (nar posası, nar kabuğu, nar çekirdekleri) açığa çıkmaktadır [Sarica, 2011], [Okumuş vd., 2015]. Oluşan bu nar atıkları ucuz ve bol şekilde elde edilebilmekte ve birçok alanda değerlendirilme potansiyeli olmaktadır.

Narın binlerce yıldır sağlık alanında sunduğu faydalar nedeniyle son zamanlarda narın fitokimyasal içerikleri ve bu içeriklerin etki mekanizmaları gibi alanlarda birçok çalışmalar yapılmaktadır. Nar meyveleri sahip olduğu antioksidan özelliği ile oldukça ilgi çekmektedir. Narın içerdiği antioksidan, antikanser ve antibakteriyel bileşiklerin biyofilmlere karşı da etkili olduğu belirtilmiştir [Bakkiyaraj et al., 2013].

Hicaznar çeşidi; verimliliği, taşımaya ve depolamaya uygunluğu ile diğer nar çeşitlerine göre daha çok talep görmektedir [Şahin, 2013]. Bu tez çalışmasında kullanılan Hicaznar çeşidi (*Punica granatum* L., Hicaznar), ülkemizde meyve suyu endüstrisinde en çok tercih edilen nar çeşitleri arasındadır [Türkyılmaz et al., 2017].

2.3.1. Nar Atıklarının Ülkemizdeki ve Dünyadaki Kullanım Alanları

Çeşitli bitkisel atıklar, doğal boya maddesi eldesinde doğayı kirletmemesi ve ekonomik olmaları açısından değerlendirilmektedir. Nar kabukları ile sarı, gri ve koyu haki renklerinin elde edilmesiyle kumaş boya sanayi gibi alanlarda kullanılmaktadır [Güngörmez, 2015].

Nar meyvesinden ilaç, yağ, hayvan yemi, tanen, pektin, sirke, sitrik asit, boya, mürekkep gibi ürünlerin elde edilebilmesinin yanında nar suyu işleme yan ürünleri de hayvan beslemede alternatif olarak yem kaynakları ve yem katkı maddeleri olarak kullanılabilir [Sarica, 2011].

Ayrıca, nar kabuğunun tozu; içerdiği beta-karoten, potasyum, fosfor ve kalsiyumdan dolayı diş tozu olarak yararlanılabildiği belirtilmiştir [Sangeetha and Vijayalakshmi, 2011].

Ancak, nar atıklarının sadece bir kısmı boyar madde, yem gibi alanlarda kullanılmakta ve geriye kalan kısımları doğaya bırakılarak çevre kirliliğine ve toprağın dengesinin bozulmasına sebep olmaktadır.

2.3.2. Nar Atıklarının Özellikleri

Narın meyve suyu olarak işlenmesinden geriye kalan yan ürünler uygulanan işleme yöntemine göre %35 ile %50 arasında değişiklik göstermektedir [Türkyılmaz et al., 2017]. Fenolik bileşikler ve organik asit gibi biyoaktif bileşiklerin nar çeşitleri arasında önemli farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların nar çeşidinin spesifik karakteristiğine, fertilizasyonuna ve spreyleme gibi kültürel uygulamalarına, yetiştiği bölgenin iklimine, toprağın karakteristiğine bağlı olduğu belirtilmektedir [Gundogdu and Yılmaz, 2012]. Hasat, depolanma ve analiz gibi aşamalarda organik asit miktarlarında değişimlere ve reaksiyonlardan kaynaklı kayıplara sebep olduğu da

yapılan çalışmalarca belirtilmiştir [Gundogdu and Yilmaz, 2012]. Bundan dolayı aynı ortamda yetişmiş olan spesifik bir çeşidin kullanılması önemli bir parametredir.

Narın yaklaşık %50'sini oluşturan kabuk kısmının biyoaktif bileşiklerce zengin olduğu yapılan çalışmalarca ortaya konmuştur. Bu biyoaktif bileşiklerin; fenolikler, flavonoidler, elajitaninler, proantosiyanidin bileşikler, kompleks polisakkaritler ve potasyum, nitrojen, kalsiyum, fosfor, magnezyum ve sodyum gibi minareller olduğu bildirilmiştir [Jahfar et al., 2003], [Li et al., 2006], [Mirdehghan and Rahemi, 2007], [Viuda-Martos et al., 2010].

Narın ekirdek kısmının ise, yağlarca zengin olduğu ve protein, ham lifler, vitaminler, mineraller, pektin, şekerler, polifenoller, izoflavonlar gibi içerikleri barındırdığı belirlenmiştir [El-Nemr et al., 2006], [Syed et al., 2007], [Viuda-Martos et al., 2010].

Gundogdu ve Yilmaz (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, nar suyunda organik asit olarak en çok sitrik asitin (0.6743 gL^{-1}) bulunduğunu ayrıca oksalik asit (0.1712 gL^{-1}), malik asit (0.5005 gL^{-1}), süksinik asit (0.0654 gL^{-1}), tartarik asit (0.0833 gL^{-1}), laktik asit (4.516 gL^{-1}) ve fumarik asit (0.1266 gL^{-1}) gibi organik asitleri içerdiğini belirtmişlerdir.

Türkyılmaz ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada; β punikalajinin nar kabuğundaki başlıca polifenol olduğu, nar kabuğunun narın zar kısmından daha fazla miktarda elajik asit içerdiği ve çekirdeğinin narın en az elajik asit türevi içeren kısmı olduğu belirtilmiştir.

Nar ve kısımlarının antibakteriyel aktivitesi; içerdiği polifenollerin türüne, hedefledikleri mikroorganizmaların türüne, yapısal farklılıklarına ve metabolik özelliklerine göre değişmektedir [Raybaudi-Massilia et al., 2009], [Türkyılmaz et al., 2017]. Polifenollerin hidroksil gruplarının sayısı, mikroorganizmalara karşı toksisiteyi etkilediğinden, nar kısımlarının polifenollerinin türü antibakteriyel aktivite gösterebilmesi açısından oldukça önemlidir [Türkyılmaz et al., 2017]. Narın biyoaktif özelliklerinin içerdiği taninlerin, özellikle de elajitaninler varlığından kaynaklandığı belirtilmektedir. Nar kabuğu, bol miktarda elajitaninler içermekte ve bu elajitaninler asit hidrolizi ile elajik aside dönüşmektedir [Lu and Yuan, 2008]. Punikalajin ve elajik asit, elajitaninlerin kapsamına girmektedir ve antibakteriyel, antioksidan, antikanser ve enfeksiyon giderici gibi etkilere sahiptirler [Adams et al., 2006], [Glazer, et al., 2012], [Bakkiyaraj et al., 2013].

Hayrapetyan ve arkadaşları (2012) tarafından; fenolik bileşiklerin potansiyel antibakteriyel aktivitelerinin, mikroorganizmanın türü ve hücre duvarının yapısı gibi çeşitli faktörlere göre farklılık gösterebildiği belirtilmiştir. Fenolik bileşikler, enzimleri denatüre edebilirler. Ayrıca bu fenolik bileşikler; mineraller, vitaminler ve karbonhidratlar gibi substratlara da bağlanarak bunları mikroorganizmalar tarafından kullanılamaz hale getirebilirler [Hayrapetyan et al., 2012]. Fenoller, mikroorganizmaların hücre zar yapısının ve işlevinin bozulmasına da neden olmaktadır [Stern et al., 1996], [Furneri et al., 2002], [Hayrapetyan et al., 2012].

2.3.3. Nar Atıklarından Biyoaktif Bileşik Eldesi

Günümüzde gıda endüstrisinde uygulanan dezenfektan kalıntılarının ekipmanlara zarar vermesi ve bu kalıntıların gıdalara bulaşarak insan sağlığı açısından tehlike oluşturmasından dolayı doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanlara ilgi giderek artmaktadır. Bu doğrultuda, dünya ülkeleri arasında nar yetiştiriciliğinde üçüncü sırada yer alan ülkemizde narın işlenmesi sonucunda çok fazla miktarda atık elde edilmesi göz önünde bulundurularak katma değeri yüksek bu atıkların gıda endüstrisinde dezenfeksiyon işlemlerinde değerlendirilebilmesi önemlidir.

Fenolik bileşikler, her meyve ve sebze az veya çok miktarda bulunmalarına rağmen meyvelerde, sebzelere oranla daha fazla miktarda oldukları belirtilmektedir [Yıldız ve Baysal, 2013]. Yapılan bazı çalışmalarda, kırmızı meyvelerde, antosiyaninler ve fenolik bileşikler gibi biyoaktif bileşiklerin daha yüksek düzeyde olduğu belirtilmektedir [Neill et al., 2002], [Neill and Gould, 2003], [Hughes et al., 2005], [Shao et al., 2007], [Abacı ve Sevindik, 2014]. Bitkilerin kimyasal farklılıklarından dolayı, tüm bitkilerden biyoaktif bileşik eldesi için tek bir çözücü ile tek bir ekstraksiyon metodu geliştirilmesi neredeyse imkansızdır [Singh, 2014]. Biyoaktif bileşiklerin eldesi üzerine Türkyılmaz ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada; narın kabuğu ile hazırlanan ekstraktlarda en etkili çözücülerin %70 (v/v) oranında sulandırılmış aseton ve etanol olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, narın atık kısımlarındaki en yüksek toplam fenolik içerik miktarlarının sırasıyla en çok kabuk, ardından zar ve en az çekirdekte bulunduğu belirtilmiştir. Elfalleh ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise; narın kabuk, çekirdek, yaprak ve çiçek kısımları ile metanol kullanılarak hazırlanan ekstraktlarda,

narın denenen tüm kısımlarında (çekirdek hariç) fazla miktarda fenolik bileşikler elde edilmiştir. Ibrahim (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, nar kabuğundan antibakteriyel ve antioksidan ajanların eldesinde en etkili çözücünün etanol olduğu belirtilmiştir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan nar atıkları yerel bir meyve suyu işletmesinden (Tropical vitamin bar, Pendik, İstanbul) temin edildi. Elajik asit standardı, Apollo Scientific (Stockport, Birleşik Krallık)'ten ve punikalajin standardı, Sigma Aldrich (Darmstadt, Almanya)'ten satın alındı. Kullanılan metanol, etanol, aseton, hidroklorik asit (HCl), asetik asit, etil asetat, formik asit, toluen, asetonitril (HPLC Grade), glukoz, fruktoz, sukroz, gentamisin sülfat ve klor, Merck (Darmstadt, Almanya)'ten sağlandı. Kaba filtre için, Whatman No.1 filtre kağıdı (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Ayrıca, 0.22 veya 0.45 µm gözenek çaplı filtreler Sartorius (Göttingen, Almanya)'tan temin edildi. TLC silika jel 60 Merck (Almanya)'ten sağlandı. Biyofilm çalışmaları için, 96 kuyulu mikrotitrasyon plakları (Sigma Aldrich, TPP, Tissue Culture Plates, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Demir (III) heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Sigma Aldrich (Darmstadt, Almanya)'ten sağlandı. Mueller Hinton Broth, Triptik Soy Broth, agar, maltoz, Biolife (Milano, İtalya)'tan ve kristal viyole Biomerieux (Marcy-l'Étoile, Fransa)'ten temin edildi. HPLC ile şeker miktarlarının analizi için, GL Sciences (Tokyo, Japonya) Inertsil NH_2 kolonu (5 µm, 4.6x250 mm) ile punikalajin, elajik asit ve organik asit içeriklerinin miktarlarının belirlenmesi için Kromasil AkzoNobel (Bohus, İsveç) C18 (5 µm, 4.6x150 mm) kolonları kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Nar atıklarını kurutmak için Virtis Ultra Wizard 2.0 model bir liyofilizatör cihazı (Warminster, ABD) ve diğer işlemler için bir öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Düzce, Türkiye), bir hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya) ve bir manyetik karıştırıcı (IKAMAG, Wilmington, Almanya) kullanıldı. Su banyosu olarak, Wise Clean (Ultrasonik Cleaner WUC-A06H, Gangwon, Kore) cihazı kullanıldı. Santrifüj

işlemleri ise bir santrifüj cihazı ile (Gyrozen 1248R, Seul, Kore) yapıldı. Evaporasyon işlemleri, bir evaporatör cihazı kullanılarak (Heidolph Hei-VAP value, Bavyera, Almanya) gerçekleştirildi. Çalkalamalı inkübasyon, bir çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific Excella E24, New Jersey, ABD) ile yapıldı. Bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunluğunu belirlemek için bir spektrometre cihazı (Shimadzu UV 1800, Kyoto, Japonya) kullanıldı. Kültürlerin inkübasyonu bir inkübatör cihazı (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) ile gerçekleştirildi. Biyofilm oluşumu, bir ELISA cihazı (BMG LABTECH FLUOstar Omega, Offenburg, Almanya) ile belirlendi. Ekstraktların pH değerleri, bir pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) ile tespit edildi. HPLC analizlerinde, Refraktif Index (RID; RID-10A), Fotodiyot (Photodiode array, PDA, SPD-M30A) ve Ultraviyole (UV, SPD-20A) dedektörlerine sahip olan bir HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanıldı. Bu tez çalışmasında steril olarak kullanılması gereken malzemeler deneylere başlanmadan önce bir otoklav cihazı (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) kullanılarak steril edildi.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu çalışmada, farklı oranlarda (P1 ve P2) hazırlanmış nar atığı ekstraktlarının (A-G, Tablo 3.1 ve 3.2) antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesinde *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus cereus* ATCC 11778 suşları kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Nar Atıklarının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan nar atıkları (Hicaz narının meyve suyu sıkımı sonrası kalan kısımları: kabuk, zar ve çekirdek) bir yerel taze meyve suyu işletmesinden temin edildi. Temin edilen nar atıkları, bozulmayı önlemek için bekletilmeden +4°C'de saklandı. Nar atıkları bir liyofilizatör cihazı (Vitris Ultra) ile -30°C'de 5 saat süre ile dondurulduktan sonra cihaz vakumu 10 pascal (Pa) basınca ayarlanarak +20 °C'de 24 saat süre ile kurutuldu. Kurutulan nar atıkları bir öğütücü

(Sinbo) yardımı ile toz hale getirildi. Elde edilen nar atığı tozları sonraki kullanıma kadar +4°C’de saklandı.

3.2.2. Ekstraksiyon

Nar atıklarının potansiyel fenolik bileşik ve organik asit içeriklerini elde etmek için farklı ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Bunun için elde edilen nar tozlarından farklı oranlarda (P1 ve P2, w/v) hazırlanan ekstraktların (A-G; Tablo 3.1) farklı sulandırma oranları Tablo 3.2’de gösterildiği gibi hazırlandı. 2 farklı nar atığı toz oranı ile farklı çözücüler (A-G) kullanılarak hazırlanan ekstrakt metotları, P1 ve P2 metotları olarak isimlendirildi (Tablo 3.1 ve 3.2). P1 metodu ile yapılan ekstraksiyon, 10 g nar tozu ve 100 mL çözücü ile (1:10, w/v), P2 metodu ise 5 g nar tozu ve 100 mL çözücü (1:20, w/v) kullanılarak hazırlandı [Dong et al., 2008 ve Qu et al., 2010 çalışmalarından değiştirilerek uygulandı]. Hazırlanan bu karışımlar bir gece boyunca +4°C’de bekletildi [Türkyılmaz et al., 2017]. Daha sonra, karışımlar bir ultrasonik su banyosunda 50°C sıcaklıkta farklı sürelerde (30 ve 120 dakika) bekletilerek farklı ekstraktlar hazırlandı (A-G, Tablo 3.1) [Altemimi et al., 2015]. Hazırlanan ekstraktlar, 4000 rpm, +4 °C’de, 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı, kaba filtre kağıdı (Whatman no.1) yardımı ile süzülerek evaporasyon için hazırlandı. Evaporasyon işlemi, bir vakumlu evaporatör cihazında (Heidolph Hei-VAP value, Bavyera, Almanya) alkol ve asidi uzaklaştırmak için 20-40 dakika süre ile gerçekleştirildi. Fenolik bileşikler gibi biyoaktif bileşiklerin yıkıma uğramaması için evaporatör cihazının su banyosunun sıcaklığının 60°C’yi geçmemesine dikkat edildi [Meral, 2016]. Evaporasyon işlemi, ayırıştırma haznesindeki toplanan sıvı miktarının karışıma eklenen çözücü miktarlarına ulaşınca kadar devam ettirildi. Daha sonra ekstraktlar, 4000 rpm +4°C’de 15 dakika süre ile santrifüj edilip, 0.45 µm gözenek çaplı filtrelerden (Sartorius, Almanya) geçirilerek tüplere ayrıldı. Elde edilen ekstraktlar ışıktan korunacak şekilde +4 °C’de bir sonraki kullanıma kadar saklandı.

Hazırlanan ekstraktlar; TLC, HPLC, standart agar kuyu difüzyonu, biyofilm oluşumunu önleme ve ortadan kaldırma uygulamalarının öncesinde farklı oranlarda distile su ile seyreltildi (Tablo 3.2). Ayrıca hazırlanan ekstraktların direkt ve sulandırılmış oranlarının pH değerleri ölçüldü.

Tablo 3.1: Farklı oranlarda nar atığı tozları (P1 ve P2) ile farklı çözücüler (EtOH: etanol, MeOH: metanol, HCl: Hidroklorik asit, aseton, Ds: distile su) kullanılarak elde edilen farklı ekstraktlar (A-G).

Ekstrakt	Çözücü	Oran (%, v/v)	Ekstraksiyon Süresi (dakika)	Kaynaklar
A	EtOH:Ds	60:40	120	Lu and Yuan, 2008
B	EtOH:Ds	60:40	30	Lu and Yuan, 2008; Altemimi et al., 2015
C	MeOH:Ds	80:20	30	Lu ve Yuan, 2008; Hayrapetyan et al, 2012; Zhu and Liu, 2013; Altemimi et al., 2015
D	EtOH:HCl:Ds	60:5:35	30	Bakkiyaraj et al., 2013; Zhu and Liu, 2013; Altemimi et al., 2015; Türkyılmaz et al., 2017
E	MeOH:HCl:Ds	80:5:15	30	Hayrapetyan et al, 2012; Zhu and Liu, 2013; Altemimi et al., 2015; Türkyılmaz et al., 2017
F	Aseton:Ds	70:30	30	Altemimi et al., 2015; Türkyılmaz et al., 2017
G	Ds	100	30	Lu and Yuan, 2008; Altemimi et al., 2015; Türkyılmaz et al., 2017

3.2.2.1. Farklı Çözücüler ile Ekstraksiyon Metotları

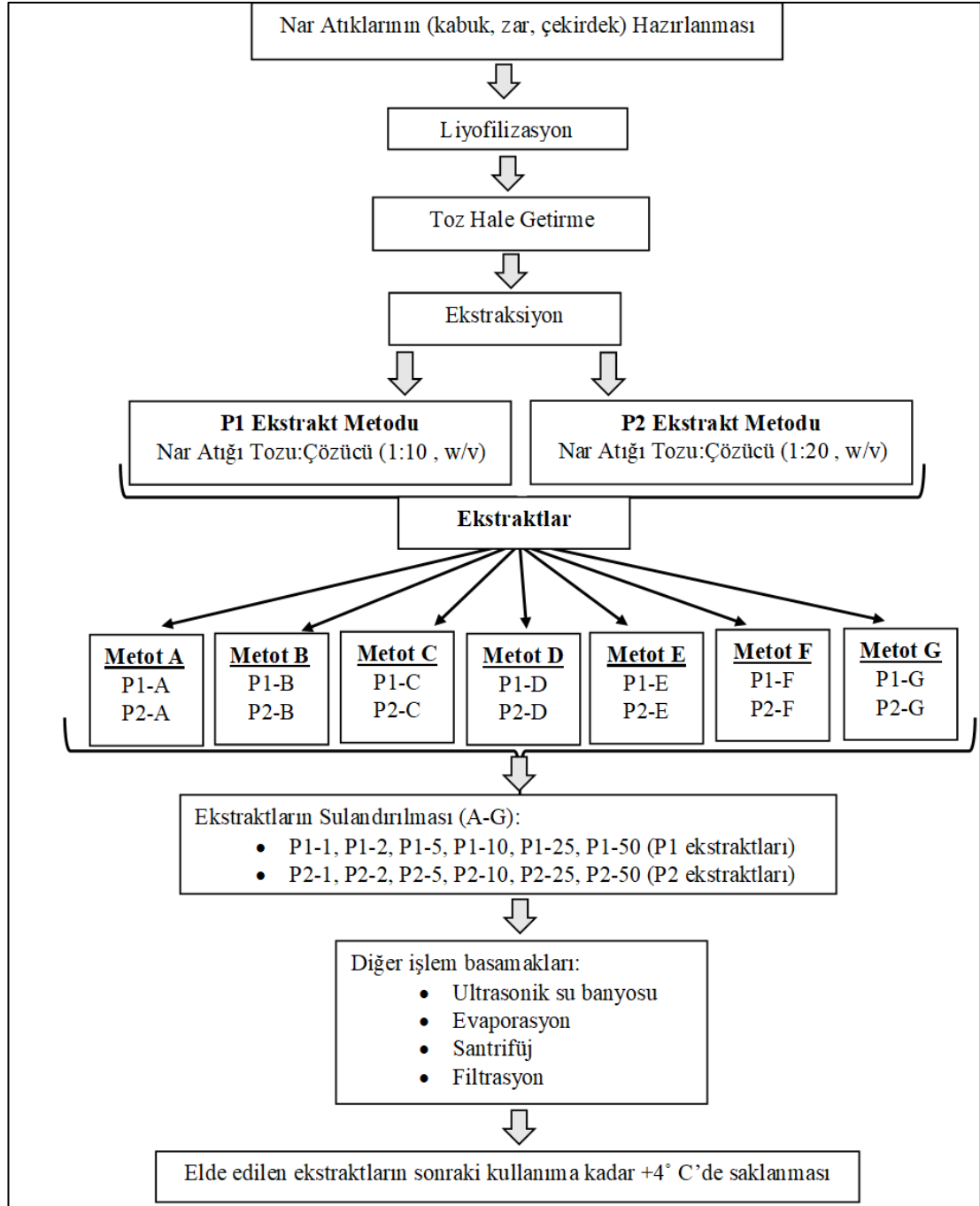
Farklı ekstraksiyon metotları için, farklı oranlarda nar atığı tozlarına (P1: 10 g nar atığı tozu ve P2: 5 g nar atığı tozu) [Lu and Yuan, 2008; Dong et al., 2008 ve Qu et al., 2010 çalışmalarından değiştirilerek uygulandı] hazırlanan farklı çözücülerden (A: %60 EtOH; B: %60 EtOH; C: %80 MeOH; D: %60:5:35 EtOH:HCl:Ds; E: %80:5:15 MeOH:HCl:Ds; F: %70 aseton, G: su) ayrı ayrı 100 ml ilave edildi. Bu karışımlardan bir ultrasonik su banyosunda 50°C'de 30 dakika süre (sadece A metodunda 120 dakika) ile ekstraksiyon yapıldı [Altemimi et al., 2015; Lu and Yuan, 2008 çalışmalarından değiştirilerek uygulandı].

3.2.3. Farklı Metotlar ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının Sulandırma Oranları

P1 (1:10, w/v) metodu ile 7 farklı ekstrakt (A-G) hazırlandı. P1 metodu ile farklı çözücüler (A-G; Tablo 3.1) kullanılarak hazırlanan ekstraktlar; P1-A, P1-B, P1-C, P1-D, P1-E, P1-F ve P1-G olarak isimlendirildi (Tablo 3.2). Bu ekstraktlar da 1:2 (v/v, P1-2), 1:5 (v/v, P1-5), 1:10 (v/v, P1-10), 1:25 (v/v, P1-25) ve 1:50 (v/v, P1-50) oranlarında sulandırıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Farklı oranlarda nar atığı tozu içeren metotlar (P1 ve P2) ve farklı çözücüler (A-G) kullanılarak hazırlanan ekstraktlar ile sulandırma oranları (EtOH: etanol, MeOH: metanol, HCl: Hidroklorik asit, Ds: distile su, DE: Ekstrakt).

Ekstraktların Hazırlanması						Ekstraktların Sulandırılması	
Metot	Nar atığı tozu: çözücü (w/v)	Ekstraktların (A-G) kısaltmaları	Kullanılan Çözücüler	Kullanılan çözücülerin oranları (% v/v)	Ekstraksiyon Süresi (dakika)	Ekstraktların (A-G) sulandırma oranlarının kısaltmaları	Kullanılan ekstraktların sulandırma oranları (v/v, ml)
P1	1:10	P1-A	EtOH:Ds	60:40	120	P1-1	DE
	1:10	P1-B	EtOH:Ds	60:40	30	P1-2	1:2
	1:10	P1-C	MeOH:Ds	80:20	30	P1-5	1:5
	1:10	P1-D	EtOH:HCl:Ds	60:5:35	30	P1-10	1:10
	1:10	P1-E	MeOH:HCl:Ds	80:5:15	30	P1-25	1:25
	1:10	P1-F	Aseton:Ds	70:30	30	P1-50	1:50
	1:10	P1-G	Ds	100	30		
P2	1:20	P2-A	EtOH:Ds	60:40	120	P2-1	DE
	1:20	P2-B	EtOH:Ds	60:40	30	P2-2	1:2
	1:20	P2-C	MeOH:Ds	80:20	30	P2-5	1:5
	1:20	P2-D	EtOH:HCl:Ds	60:5:35	30	P2-10	1:10
	1:20	P2-E	MeOH:HCl:Ds	80:5:15	30	P2-25	1:25
	1:20	P2-F	Aseton:Ds	70:30	30	P2-50	1:50
	1:20	P2-G	Ds	100	30		



Şekil 3.1: Nar atığı tozu ile hazırlanan ekstraktların eldesi için uygulanan işlem basamakları.

P2 (1:20, w/v) metodu ile de 7 farklı ekstrakt hazırlandı. P2 metodu ile farklı çözücüler (A-G; Tablo 3.1) kullanılarak hazırlanan ekstraktlar; P2-A, P2-B, P2-C, P2-D, P2-E, P2-F ve P2-G olarak isimlendirildi (Tablo 3.2). Bu ekstraktlar da 1:2 (v/v, P2-2), 1:5 (v/v, P2-5), 1:10 (v/v, P2-10), 1:25 (v/v, P2-25) ve 1:50 (v/v, P2-50) oranlarında sulandırıldı (Tablo 3.2).

3.2.4. Fenolik Bileşiklerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin (punikalajin ve elajik asit) tespiti için TLC metodu kullanıldı. TLC metodunda en belirgin leke görüntüsünü alabilmek için 8 farklı yürütücü faz denendi (Tablo 3.3). TLC yöntemi ile belirlenen fenolik bileşiklerin içeriği HPLC analiz yöntemi ile de karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Tablo 3.3: Nar atığı tozları ile hazırlanan farklı ekstraktlarda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan farklı TLC yürütücü fazları (EtAs: Etil asetat, GA: glasiyel asetik asit, FA:formik asit, TOL:toluen, Ds: distile su).

Yürütücü Faz (MP)	Oran (v/v, mL)	Kaynaklar
MP1(EtAs: FA: Ds)	10:2:3	Altemimi et al., 2015
MP2 (EtAs: GA: Ds)	10:2:3	Bu tez çalışmasında
MP3 (EtAs: GA: FA: Ds)	100:11:11:26	Kumar et al., 2011
MP4 (EtAs: GA: FA: Ds)	100:11:11:10	Kumar et al., 2011
MP5 (EtAs: GA: FA: Ds)	100:11:11:5	Kumar et al., 2011 çalışmasından değiştirilerek uygulandı
MP6 (EtAs: GA: FA)	100:11:11	Kumar et al., 2011 çalışmasından değiştirilerek uygulandı
MP7 (TOL: EtAs: FA: MeOH)	3:3:0.8:0.2	Bakkiyaraj et al.,2013
MP8 (EtAs: MeOH: Ds)	81:11:8	Growther, et al.,2012

Yürütücü faz, cam tank içerisine plakayı koymadan en az 30 dakika öncesinde yüklendi [Altemimi et al., 2015]. Yürütücü fazın hizası, TLC plakasında örneklerin yüklendiği hizanın altında kalacak seviyede ayarlandı. TLC işleminde, öncelikle silika TLC jel plakanın nemin gitmesi için plaka bir kurutma makinası ile kurutuldu ve ardından plakanın soğuması beklendi [Altemimi et al., 2015]. Standartlar ve farklı oranlarda sulandırılan nar ekstraktları (Tablo 3.2) sırasıyla işaretlenen yerlere mikro şırınga ile 1 µL olacak şekilde damlatıldı. Örneklerin yüklendiği bölge, her yükleme sonrası bir kurutma makinası ile kurutuldu ve ardından soğutulması sağlandı. Her bir ekstrakt, her defasında, aynı noktalara 1'er µL yüklenerek 3 µL'ye tamamlandı. TLC plakası kurutulup soğutulduktan sonra

yürütücü fazın yüklendiği tanka eğimli bir şekilde yerleştirildi. Yürütme işlemi, plaka üzerinden 1 cm hiza kalıncaya kadar gerçekleştirildi. Daha sonra plaka kurutularak plakanın soğuması beklendi. Fenolik bileşiklerin görünür hale gelmesi için, TLC plakası üzerine %5 FeCl₃ çözeltisi damlatıldı [Growther et al., 2012].

3.2.5. Fenolik Bileşik, Organik Asit ve Şeker Miktarlarının Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi

Bu çalışmada, 14 farklı metot (P1 metodu ile 7 ve P2 metodu ile 7) ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) fenolik bileşik (punikalajin ve elajik asit), organik asit (malik ve sitrik asit) ve toplam şeker miktarları HPLC analiz yöntemi ile belirlendi. Hazırlanan ekstraktlar 10000 rpm hızında 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvı 0.22 µm gözenek çaplı filtreden geçirilerek safsızlıklardan arındırıldı.

Şeker miktarını belirlemek için Inertsil NH₂ kolonu (5 µm, 4.6x250 mm, GL Sciences Inc.) ile Refraktif Index Dedektörü (RID)'ne sahip bir HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanıldı. Analiz yönteminin enjeksiyon miktarı 20 µL, kolon sıcaklığı 25°C ve yürütücü faz akış hızı ise 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı. Yürütücü faz olarak asetronitril (%60) ve ultra saf su (%40) karışımı kullanıldı [Sar et al., 2017]. Şeker miktarları ise; glukoz, ksiloz, fruktoz, sukroz ve arabinoz (5,10,20,40 ve 50 mg/ml) içeren standartlara göre belirlendi.

Punikalajin ve elajik asitin belirlenmesi için C18 kolonu (5 µm, 4.6x150 mm) ile Fotodiyot Dedektörü (Photodiode array, PDA) kullanılarak 255 nm dalga boyunda analiz edildi. Yürütücü faz olarak formik asit (%1) ve asetronitril olmak üzere 2 farklı solüsyon kullanıldı. Analiz süresince asetronitril solüsyonun oranı 18 dakika süre ile %15, 20 dakika süre ile %65, 25 dakika süre ile %5 ve 30 dakika süre ile %5 olacak şekilde farklı konsantrasyonlarında kullanıldı. Enjeksiyon miktarı 10 µL, kolon sıcaklığı 30°C ve yürütücü faz akış hızı ise 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı [Web 1, 2009]. %0.005-0.02 konsantrasyonlarında hazırlanan punikalajin standartları ile punikalajin miktarları ve %0.25-1 konsantrasyonlarında hazırlanan elajik asit standartları ile de elajik asit miktarları belirlendi.

Organik asit miktarlarını belirlemek için C-18 (Kromasil 5 µm, 4.6x150 mm) kolonu ve UV Dedektörü kullanıldı. Ekstraktların organik asit içeriği, sitrik asit ve malik asit (%0.1-2) içeren standartlara göre belirlendi. Yürütücü faz olarak 0.005 N

H₂SO₄ konsantrasyonu olacak şekilde ultra saf su ile hazırlanan solüsyon kullanıldı. Enjeksiyon miktarı 50 µL, kolon sıcaklığı 25°C ve yürütücü faz akış hızı ise 0.3 mL/dakika olacak şekilde kullanıldı. 210 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanılarak organik asit içeriği belirlendi [Türkyılmaz, 2013 çalışmasından değiştirilerek uygulandı].

3.2.6. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Bakteri ön kültüründe %2 glukoz içeren Triptik Soy Broth (TSB) kullanıldı. Besiyerini hazırlamak için, 30 g TSB üzerine 800 mL distile su ilave edilerek bir manyetik karıştırıcıda (IKAMAG®, Almanya) karıştırıldı. Aynı bir şişede, 20 g glukoz 200 mL distile su ile karıştırıldı. İki karışım da 121°C’de, 20 dakika süre ile ayrı ayrı otoklavlanarak (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) steril edildi. Otoklav sonrası hazırlanan besiyeri ve glukoz çözeltisi soğutulduktan sonra steril koşullar altında bir araya getirildi. Hazırlanan besiyeri, TSB_G olarak isimlendirildi. Şar ve Akbaş (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, glukoz ve süt içeren TSB besiyerleri kullanıldığında, sitrik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun önlenmesi ve ortadan kaldırılması oranları birbirine yakın bulunduğu, ve bu durumu glukoz içeren besiyeri kullanımının gıda işleme ortamlarını yansıtabileceğini belirtmişlerdir. Bundan dolayı bu çalışmada da biyofilm oluşumunun tespiti, biyofilm oluşumunun önlenmesi ile oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için TSB_G besiyeri kullanıldı.

Kuyu difüzyonu tekniğinde ve pasajlama aşamalarında kullanılmak üzere Mueller Hinton Agar (MHA) kullanıldı. MHA hazırlamak için, 22 g Mueller Hinton Broth (MHB) içerisine 15 g agar ilave edildi ve distile su ile 1 L’ye tamamlandı. Hazırlanan MHA, 121°C’de 20 dakika süre ile bir otoklav cihazında ısıtılarak steril edildi. Otoklav sonrasında MHA bir mezür yardımı ile 17 mL ölçülerek petri kaplarına steril koşullar altında paylaştırılarak katılaşması sağlandı.

Bu çalışmada kullanılan *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları, 10 mL TSB_G içeren 50 mL’lik erlenlere düzenli olarak pasajlanan katı kültürlerden bir öze yardımıyla 2-3 koloni aktarıldı. *Bacillus* suşları, 180 rpm çalkalama hızında, 30°C’de bir gece boyunca bir çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24, New Jersey, ABD) inkübe edildi. Ön kültürlerin toplam hücre sayıları bir spektrometrede

(Shimadzu UV 1800, ABD) OD_{600nm} değeri 0.6'yı geçmeyecek şekilde steril özgün besiyeri ile sulandırılarak ölçüldü. Kör olarak ise steril özgün besiyeri kullanıldı.

3.2.7. Standart Agar Kuyu Difüzyonu

Agar kuyu difüzyonu metodu için ön kültürlerin yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığına (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) eş değer olacak şekilde steril fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl, FTS) ile sulandırılarak hazırlandı. 0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri kültürleri (1.5×10^8 kob/ml, *B. subtilis* ve *B. cereus*), steril koşullar altında MHA içeren petrilere 100'er µL yayma ekim yöntemi ile inokule edildi. Farklı metotlar ile hazırlanan ekstraktların (Tablo 3.1 ve 3.2) antibakteriyel etkisini test etmek için 7 mm çapında kuyular açıldı. Her bir kuyuya 40 µL ekstrakt yüklendi. Ekstraktların antibakteriyel etkisi 40 µL gentamisin (1 mg/mL) ile kıyaslandı [Joy and George, 2014]. Ekstraktların difüzyonunun sağlanması için petri kapları oda sıcaklığında 30 dakika süre ile bekletildi. Daha sonra 30°C sıcaklıktaki bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası inhibisyon zon çapları (mm) bir cetvel yardımı ile ölçüldü.

3.2.8. Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması

3.2.8.1. Biyofilm Oluşturma Kapasitesi

B. subtilis ve *B. cereus* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi için bir steril kabin içerisinde, 96 kuyulu mikrotitrasyon plağının her bir kuyusuna 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5×10^8 kob/mL) TSB_G ile hazırlanan kültürlerden 150 µL yüklendi. Mikrotitrasyon plakları, 48 saat süre boyunca 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürler nazikçe dökülerek üçer kez distile su ile yıkanıp ters çevrilerek kurutuldu. Her bir kuyuya 150 µL kristal viyole solüsyonu (%0.5, w/v) yüklendi ve 20 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kristal viyole nazikçe dökülüp üçer kez distile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra her bir kuyuya, 150 µL etanol:asetik asit (%95:5) ilave edilerek 10 dakika süre ile inkübe edildi. Bu aşamadan sonra, her kuyudan 100 µL örnek alınarak yeni bir steril polistren mikrotitrasyon plağına

aktarıldı ve 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucuda (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutuldu.

3.2.8.2. Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi

Biyofilm oluşumunun önlenmesi çalışmasında santrifüj edilmiş ve filtrelenmiş ekstraktların P2-5 ve P2-10 oranları (Tablo 3.2) ve 200 ppm klor solüsyonu steril koşullar altında mikrotitrasyon plaklarına 150'şer µL yüklendi ve 5 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ekstraktlar ve klor solüsyonu nazikçe döküldü. Klor solüsyonunun uygulandığı kuyular, 6'şar kez çoklu pipet yardımı ile distile suyla yıkandı ve daha sonra mikrotitrasyon plağı ters çevrilerek kurutuldu. Kurutulan plaklara 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan kültürlerden 150'şer µL olacak şekilde yüklendi. Ayrıca biyofilm oluşumunun kontrolü için ekstrakt uygulamasının olmadığı kuyulara bakteri kültürleri yüklendi. Kör olarak, kültür hazırlanırken kullanılan özgün besiyeri kullanıldı. Mikrotitrasyon plağının üzeri kapatılarak 48 saat süre boyunca 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürler nazikçe dökülerek üçer kez distile su ile yıkanıp ters çevrilerek kurutuldu. Her bir kuyuya 150 µL kristal viyole solüsyonu (%0.5, w/v) yüklendi ve 20 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kristal viyole nazikçe döküldü. Kristal viyole ile boyanan kuyular üçer kez distile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra her bir kuyuya, 150 µL etanol:asetik asit (%95:5) ilave edildi ve 10 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamadan sonra, her kuyudan 100 µL örnek alınarak yeni bir steril mikrotitrasyon plağına aktarıldı. 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, bir ELISA okuyucuda (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutuldu. Biyofilm oluşumlarının önlenme oranları aşağıdaki gibi hesaplandı [Pitts et al., 2003].

$$\begin{aligned} &\text{Biyofilmlerin önlenme oranı (\%)} \\ &= ((BF - BI) - (T - BI)) / ((BF - BI)) \times 100 \end{aligned} \quad (3.1)$$

BI, kör olarak kullanılan kuyulardaki ortalama absorbans değeri; BF, biyofilm oluşan kuyulardaki ortalama absorbans değeri; T ise nar atığı ekstraktlarının uygulandığı kuyulardaki ortalama absorbans değeridir.

3.2.8.3. Biyofilm Oluşumunun Ortadan Kaldırılması

Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması çalışmalarında 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan kültürler mikrotitrasyon plaklarının belirlenen kuyularına 150'şer μL yüklenerek 48 saat süre ile 30°C'de inkübe edildi. Kör olarak, kültür hazırlanırken kullanılan özgün besiyeri kullanıldı. İnkübasyon sonrası kültürler nazikçe dökülerek mikrotitrasyon plakları üçer kez distile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra, santrifüj edilmiş ve filtrelenmiş ekstraktların P2-5 ve P2-10 oranları (Tablo 3.2) ve 200 ppm klor solüsyonu steril koşullar altında mikrotitrasyon plaklarına 150'şer μL yüklendi ve 5 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ekstraktlar ve klor solüsyonu nazikçe döküldü. Klor solüsyonunun uygulandığı kuyular 6'şar kez, ekstraktların uygulandığı kuyular ise 3'er kez çoklu pipet yardımı ile distile suyla yıkandı. Mikrotitrasyon plağı ters çevrilerek kurutuldu. Her bir kuyuya 150 μL kristal viyole solüsyonu (%0.5, w/v) yüklendi ve 20 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Kristal viyole ile boyanan kuyular üçer kez distile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra her bir kuyuya, 150 μL etanol:asetik asit (%95:5) ilave edildi ve 10 dakika süre ile inkübe edildi. Bu aşamadan sonra, her kuyudan 100 μL örnek alınarak yeni bir steril mikrotitrasyon plağına aktarıldı. 570 nm dalga boyunca bir ELISA okuyucuda (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutuldu. Biyofilm oluşumlarının ortadan kaldırılması oranları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı [Pitts et al., 2003].

$$\begin{aligned} &\text{Biyofilmlerin ortadan kaldırılma oranı (\%)} \\ &= ((\text{BF} - \text{Bl}) - (\text{T} - \text{Bl})) / ((\text{BF} - \text{Bl})) \times 100 \end{aligned} \quad (3.2)$$

Bl, kör olarak kullanılan kuyulardaki ortalama absorbans değeri; BF, biyofilm oluşan kuyulardaki ortalama absorbans değeri; T ise nar atığı ekstraktlarının uygulandığı kuyulardaki ortalama absorbans değeridir.

3.2.9. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2016 programı ile yapıldı. *P* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile nar ekstraktlarının potansiyel antibakteriyel etkinliği

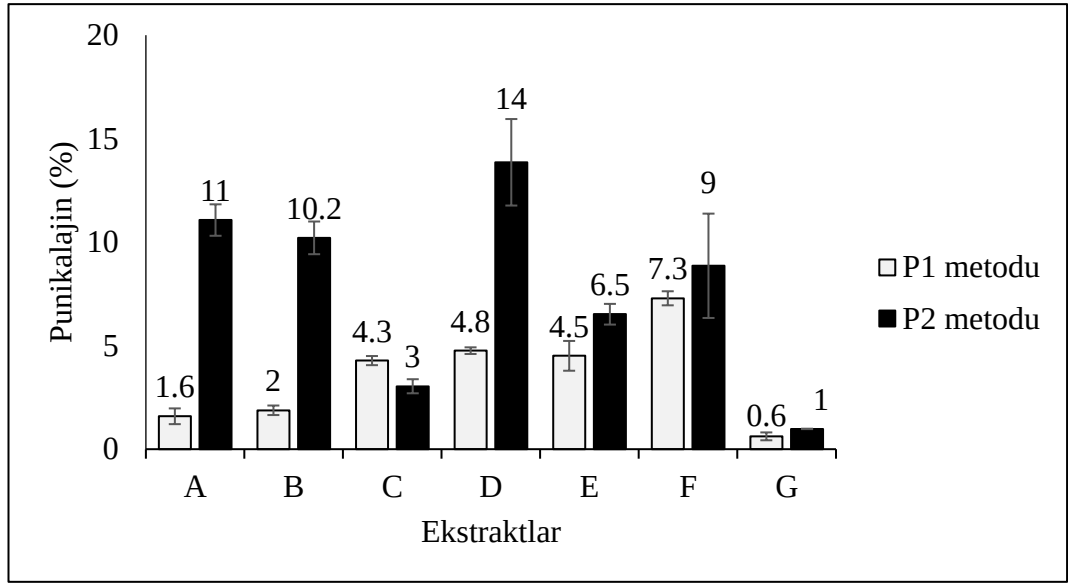
gentamisin antibiyotiği ile, antibiyofilm etkinliği ise gıda endüstrisi dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılan klor solüsyonu ile karşılaştırıldı. $P \leq 0.05$ olarak belirlenen değerler istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

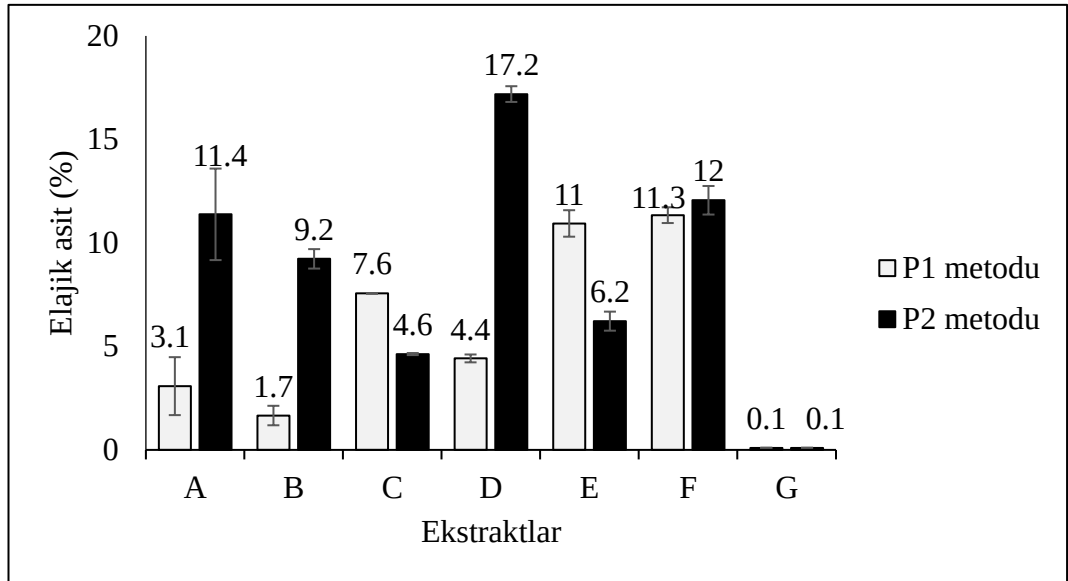
4.1. Farklı Metotlar ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının İçeriklerinin Belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin TLC yöntemi ile belirlenmesi: Nar atığı ekstraktlarının içeriğinde bulunan fenolik bileşikler (punikalajin ve elajik asit) TLC yöntemi ile tespit edildi. Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde, 8 farklı TLC metodu kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan punikalajin standartları, %0.005-0.02 ve elajik asit standartları ise, %0.25-1 konsantrasyonlarında hazırlandı. Punikalajin için denenen TLC metotları (Tablo 3.3) arasında en iyi görüntüleme, MP5 (Yürütücü faz 5) metodunda (EtAs: GA: FA: Ds, 100:11:11:10, v/v) 1:50 oranında sulandırılan (P1-50 ve P2-50 ekstraktları) farklı ekstraktların (A-G) yürütülmesi ile gözlemlendi. Elajik asitin belirlenmesi için de en iyi görüntüleme, yine MP5 metodu (EtAs: GA: FA: Ds, 100:11:11:10, v/v) ve farklı ekstraktların (A-G) 1:25 oranında sulandırılarak kullanılması (P1-25 ve P2-25 ekstraktları) ile belirlendi. TLC sonuçlarına göre, P2 metodu ile farklı çözücüler (A-G, Tablo 3.1) kullanılarak hazırlanan nar atığı ekstraktlarında fenolik bileşiklerin daha belirgin leke oluşturdukları gözlemlendi.

Fenolik bileşiklerin miktarlarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi: P1 metodu ile hazırlanan ekstraktların içerdikleri en yüksek punikalajin miktarı P1-F ekstraktı (%7.3) ile (Şekil 4.1), P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda da en yüksek punikalajin miktarı P2-D ekstraktı (%14) ile tespit edildi (Şekil 4.1). P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlar karşılaştırıldığında, HPLC sonuçlarına göre, P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlardan en yüksek içerdikleri elajik asit miktarları P1-F ekstraktı (% 11.3) ile belirlenirken, P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlar arasından ise P2-D ekstraktı (%17.2) ile tespit edildi (Şekil 4.2). Ayrıca, elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.1 ve 4.2); P2-C ekstraktının punikalajin (%3) ile elajik asit (%4.6) miktarlarının, P1-C (punikalajin %4.3 ve elajik asit %7.6) ekstraktından daha az, P2-E ekstraktının elajik asit miktarının (%6.2) da P1-E ekstraktından (%11) daha az olması dışında, ekstraktlar arasında en yüksek fenolik bileşik miktarları P2 metodu (1:20, w/v) ile hazırlanan ekstraktlarda belirlendi.



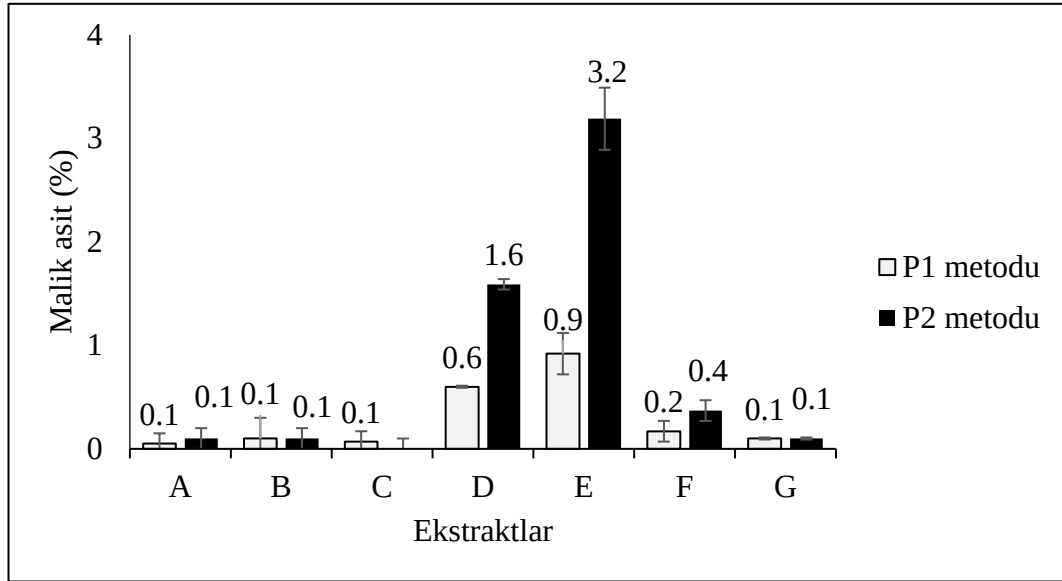
Şekil 4.1: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri punikalajin miktarları (%). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.2: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri elajik asit miktarları (%). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

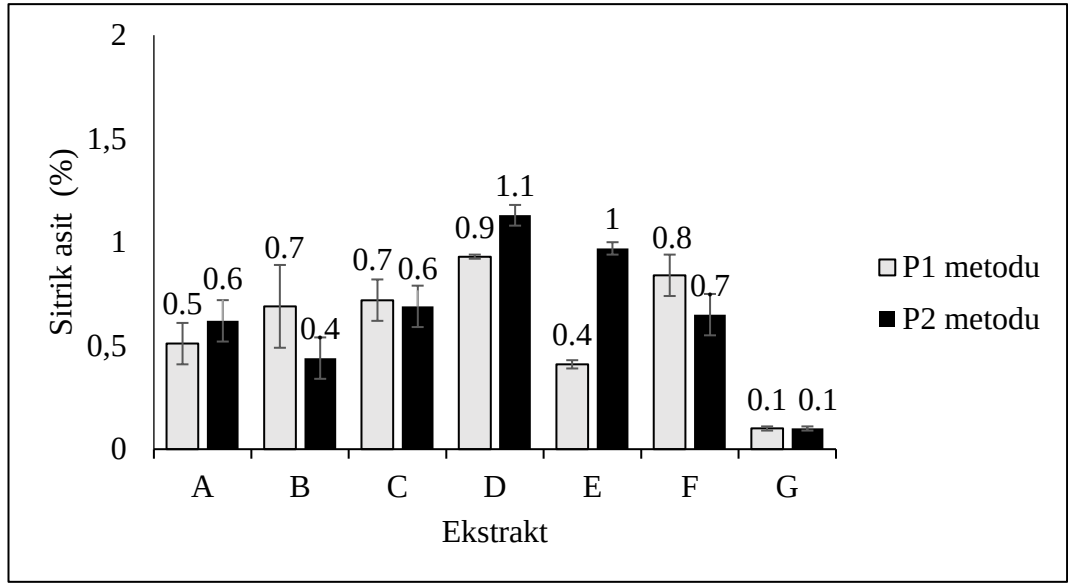
Ekstraktların içerdikleri organik asit miktarlarının belirlenmesi: HPLC analizi sonuçlarına göre ekstraktların içerdikleri en yüksek malik asit miktarları; P1 metodu ile hazırlanan P1-E (%0.9) ve P1-D (%0.6) ekstraktlarında belirlenirken, P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda da en yüksek, P2-E (%3.2) ve P2-D (%1.6) ekstraktlarında tespit edildi. P1 ve P2

oranında ultrasonik su banyosunda 50°C sıcaklıkta farklı ekstraksiyon süreleri ile hazırlanan ekstraktların malik asit miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi (Şekil 4.3).



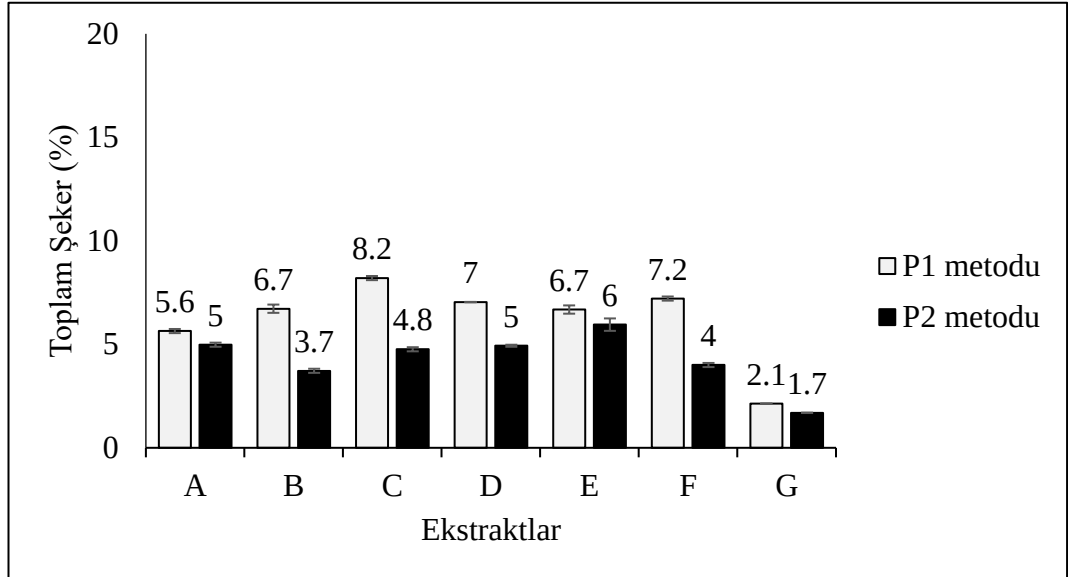
Şekil 4.3: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri malik asit miktarları (%). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

HPLC sonuçlarına göre ekstraktların içerdikleri sitrik asit miktarları incelendiğinde ise, P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda, en yüksek sitrik asit miktarları, P1-D (%0.9) ve P1-F (%0.8) ekstraktlarında belirlenirken, P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda en yüksek sitrik asit miktarları, P2-D ekstraktı (% 1.1) ve P2-E ekstraktlarında (%1) tespit edildi. Ayrıca, P1 ve P2 metotları ile ultrasonik su banyosunda 50°C sıcaklıkta farklı süreler ile ekstraksiyon yapılarak hazırlanan ekstraktlarda, en yüksek sitrik asit miktarı, 30 dakika ekstraksiyon süresi ile hazırlanan P1-B ekstraktında (%0.7) belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri sitrik asit miktarları (%). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Ekstraktların içerdikleri toplam şeker miktarları, P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda %2.1-8.2 ve P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda ise %1.7-6.0 olarak belirlendi. Hazırlanan farklı ekstraktlar arasında en çok şeker miktarı; P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlar arasında P1-C ekstraktında belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) ile hazırlanan ekstraktların (A-G) içerdikleri toplam şeker miktarları (%). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Ekstraktların pH değerlerinin belirlenmesi: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan ekstraktların pH değerleri belirlendi (Tablo 4.1). Biyofilm çalışmalarında kullanılan klor solüsyonunun pH değeri 9.65 olarak ölçüldü. P1 ve P2 metotları ile hazırlanan ekstraktların pH değerleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi. Ancak, HCl içeren ekstraktlarda sulandırma oranı arttıkça beklendiği gibi pH değerinde de artış gerçekleşti (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan ekstraktların (A-G) pH değerleri.

Ekstraktlar (P1)	pH	Ekstraktlar (P2)	pH
P1-A	3.1	P2-A	3.4
P1-B	3.1	P2-B	3.3
P1-C	3.3	P2-C	3.4
P1-D	0.1	P2-D	0.1
P1-E	0.1	P2-E	0.1
P1-F	3.1	P2-F	3.5
P1-G	3.5	P2-G	3.6

4.2. Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının *B. subtilis* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi

Farklı yöntemler ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının *B. subtilis* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri kuyu difüzyon yöntemi ile belirlendi.

4.2.1. P1 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının *B. subtilis* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

P1 metodu ile hazırlanan ekstraktların farklı sulandırma oranlarının (Tablo 3.1 ve 3.2) *B. subtilis* suşu üzerindeki etkisi, MHA içeren petriler üzerinde 100'er µL *B. subtilis* kültürünün yayma ekim yapılması ve ardından petriler üzerinde açılan 7 mm çapındaki kuyulara 40'ar µL olacak şekilde farklı ekstraktların yüklenmesi ile belirlendi. Uygun inkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zon çapları ölçülürken kuyuların çapları (7 mm) ölçüme dahil edildi.

P1 metodu ile elde edilen ekstraktlar arasında en yüksek inhibisyon zon çapı metanol, %37'lik HCl ve distile su karışımı ile hazırlanan ekstraktın (P1-E) sulandırılmadan direkt olarak (P1-1) uygulanması ile 34 mm zon çapı olarak elde edildi. En az antibakteriyel etki ise su kullanılarak elde edilen ekstraktın (P1-G) sulandırılmadan direkt olarak (P1-1) uygulanması sonucu 15 mm zon çapı ile belirlendi (Şekil 4.6).

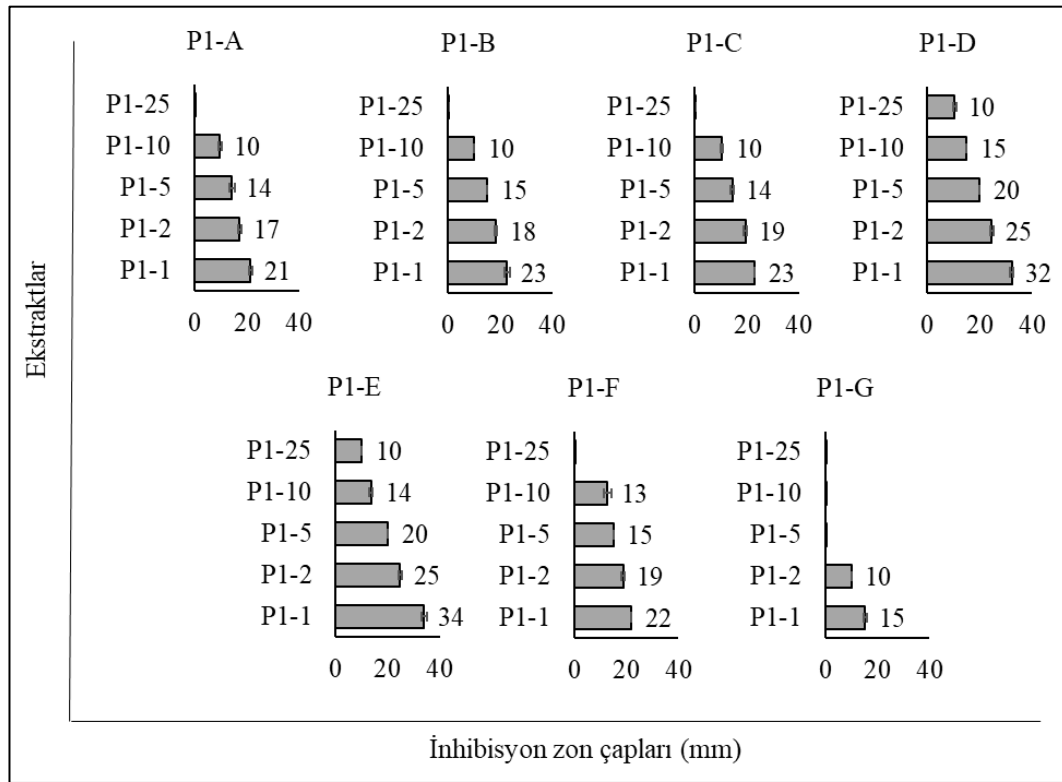
P1 metodu ile hazırlanan ekstraktların 1:2 sulandırılmasıyla elde edilen ekstraktların (P1-2) gösterdiği en yüksek antibakteriyel etki, 25 mm inhibisyon zon çapları oluşturan P1-D ve P1-E ekstraktları ile belirlendi. P1 metodu ile hazırlanan ekstraktların 1:2 sulandırılmasıyla elde edilen ekstraktlardan (P1-2) en düşük inhibisyon zon çapı sonucu P1-G ekstraktının kullanımında 10 mm zon çapı ile belirlendi (Şekil 4.6).

Ekstraktların 1:5 sulandırılmaları (P1-5) arasında en etkili sonuçlar, P1-D ve P1-E ekstraktlarında 20 mm zon çapları ile tespit edildi. Farklı ekstraksiyon süreleri ile ultrasonik su banyosunda bekletilerek hazırlanan P1-A ve P1-B ekstraktlarının 1:5 oranında (P1-5) sulandırılmasıyla 14 ve 15 mm zon çapları oluşturarak benzerlik gösterdikleri belirlendi. Bu oranda sulandırılan P1-G ekstraktında ise antibakteriyel etki gözlemlenmedi (Şekil 4.6).

Hazırlanan ekstraktların 1:10 sulandırma oranlarında (P1-10) en yüksek antibakteriyel etki 15 mm zon çapı oluşturan P1-D ekstraktı ile ardından sırasıyla P1-E ve P1-F ekstraktları ile belirlendi. P1-G ekstraktında ise inhibisyon zon çapı gözlemlenmedi (Şekil 4.6).

Ekstraktların 1:25 sulandırma oranları (P1-25) sonuçlarına göre en yüksek antibakteriyel etki, 10 mm inhibisyon zon çapları oluşturan P1-D ve P1-E ekstraktları ile belirlendi. Diğer ekstraktların P1-25 oranlarında inhibisyon zon çapları tespit edilmedi (Şekil 4.6).

B. subtilis suşu üzerinde P1 metodu kullanılarak hazırlanan ekstraktlar ile elde edilen en etkili sonuç, P1-E ekstraktlarının direkt kullanımı (P1-1) ile belirlendi. P1-E ekstraktı ile oluşan zon çapının (34 mm), 34.5 mm zon çapı oluşturan gentamisin antibiyotiğine (1 mg/mL) göre farklı olmadığı belirlendi ($p=0.25$).



Şekil 4.6: P1 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P1-1, P1-2, P1-5, P1-10, P1-25) *B. subtilis* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri. Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.2.2. P2 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının *B. subtilis* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

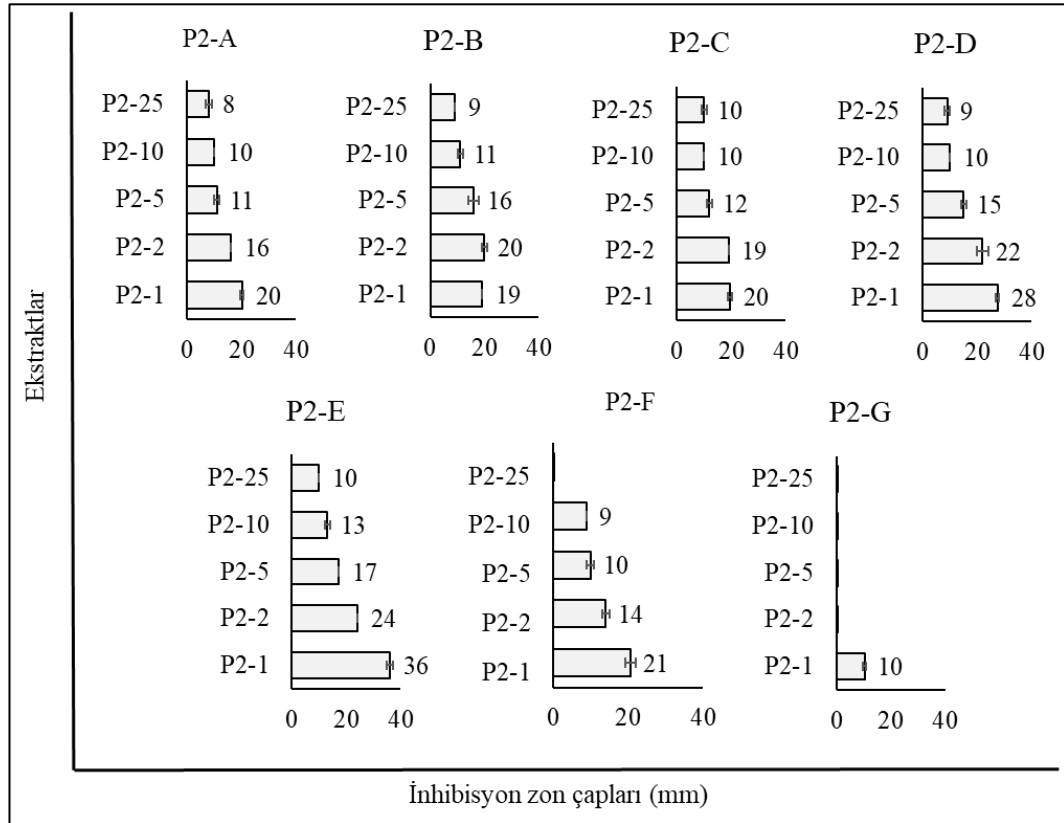
P2 metodunun farklı sulandırma oranlarının (Tablo 3.1 ve 3.2) *B. subtilis* suşu üzerindeki etkisi, MHA içeren petriler üzerinde 100'er µL *B. subtilis* kültürünün yayma ekim yapılması ve daha sonra petriler üzerinde açılan 7 mm çapındaki kuyulara 40'ar µL olacak şekilde farklı ekstraktların yüklenmesi ile belirlendi. Uygun inkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zon çapları ölçülürken kuyuların çapları (7 mm) ölçüme dahil edildi.

P2 metodu ile hazırlanan ekstraktların sulandırılmadan direkt olarak kullanılması ile elde edilen en etkili sonuç 36 mm zon çapı oluşturan P2-E ekstraktı ile gözlemlenirken, en az antibakteriyel etkiyi gösteren sonuç ise 10 mm zon çapı oluşturan sulu ekstrakt (P2-G) ile belirlendi (Şekil 4.7).

Ekstraktların (A-G) 1:2 sulandırma oranlarının (P2-2) sonuçlarına göre, en yüksek antibakteriyel etki 24 mm inhibisyon zon çapı oluşturan P2-E ekstraktı ile;

1:5 sulandırma oranlarında (P2-5) yine 17 mm zon çapı oluşturan P2-E ekstraktı ile, 1:10 sulandırma oranlarında (P2-10) 13 mm zon çapı oluşturan P2-E ekstraktı ile, 1:25 sulandırma oranlarında (P2-25) 10 mm zon çapları P1-E ile P1-C ekstraktları kullanılarak belirlendi (Şekil 4.7). P2 metodu ile elde edilen sulu ekstraktların (P2-G) sulandırma oranlarının (P2-2, P2-5, P2-10 ve P2-25) kullanılması ile inhibisyon zon çapı gözlemlenmedi (Şekil 4.7).

B. subtilis suşu üzerinde P2 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktların (A-G) kullanımı ile elde edilen en etkili sonuç, P2 metodu ile hazırlanan P2-E ekstraktının sulandırılmadan direkt kullanımı (P2-1) ile belirlendi. P2-E ekstraktı ile oluşan 36 mm inhibisyon zon çapının, 34.5 mm zon çapı oluşturan gentamisin antibiyotiğine (1 mg/mL) göre daha etkili olduğu tespit edildi ($p=0.02$).



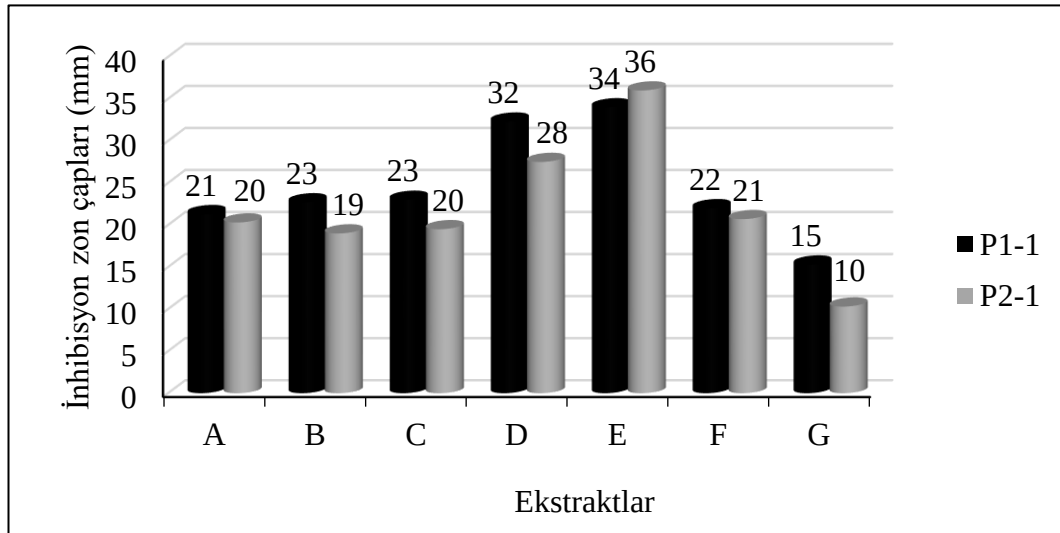
Şekil 4.7: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-1, P2-2, P2-5, P2-10, P2-25) *B. subtilis* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri. Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları antibakteriyel standart sapmaları göstermektedir.

4.2.3. P1 ve P2 Metotları ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının Sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) Kullanımlarının *B. subtilis* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

14 farklı metot ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (Tablo 3.1 ve 3.2) *B. subtilis* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri karşılaştırıldı.

P1 (1:10 w/v) ve P2 (1:20 w/v) metotları ile hazırlanan ekstraktların sulandırılmadan direkt kullanımları (P1-1 ve P2-1) ile elde edilen sonuçlara göre; en çok E ve daha sonra D ekstraktlarının *B. subtilis* suşu üzerinde antibakteriyel etkisi olduğu belirlendi.

P2-E ekstraktının P1-E ekstraktına göre daha geniş zon çapları oluşturduğu belirlendi ($p=0.09$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan farklı nar atığı ekstraktlarının sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) kullanımlarının *B. subtilis* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri. Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.3. Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının *B. cereus* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi

Farklı yöntemler ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının *B. cereus* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri kuyu difüzyon yöntemi ile belirlendi.

4.3.1. P1 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının *B. cereus* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

P1 metodunun farklı sulandırma oranlarının (Tablo 3.1 ve 3.2) *B. cereus* suşu üzerindeki etkileri, MHA içeren petriler üzerinde 100'er µL *B. cereus* kültürünün yayma ekim yapılması ve ardından petriler üzerinde açılan 7 mm çapındaki kuyulara 40'ar µL olacak şekilde farklı ekstraktların yüklenmesi ile belirlendi. Uygun inkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zon çapları ölçülürken kuyuların çapları (7 mm) ölçüme dahil edildi.

P1 metodu ile hazırlanan ekstraktların sulandırılmadan direkt olarak kullanımının sonuçlarına göre, en etkili ekstraktlar, 33 mm zon çapı ile P1-E ve 32 mm zon çapı ile P1-D olarak belirlendi (Şekil 4.9).

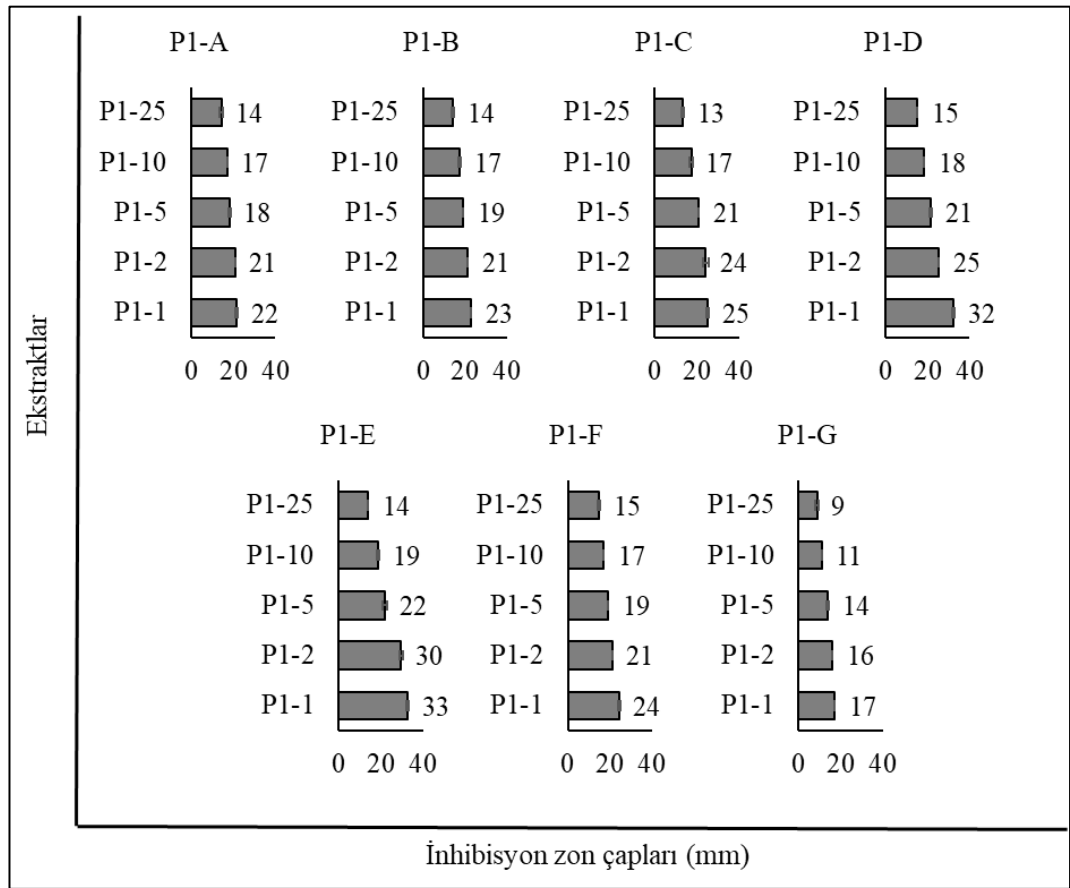
P1 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktların (A-G) 1:2 sulandırma oranlarının (P1-2) sonuçlarına göre, *B. cereus* suşu üzerindeki en yüksek antibakteriyel etki 30 mm inhibisyon zon çapı oluşturan P1-E ekstraktında belirlenirken, en az etkili ekstraktın 16 mm inhibisyon zon çapı ile P1-G olduğu belirlendi (Şekil 4.9).

Farklı ekstraktların (A-G) 1:5 sulandırma oranları (P1-5) kullanılarak elde edilen en etkili sonuç, 22 mm zon çapı ile P1-E ekstraktının kullanımı ile gözlemlendi. En düşük antibakteriyel etki ise P1-G ekstraktının kullanımında 14 mm inhibisyon zon çapı ile belirlendi. Farklı süreler ile 50°C sıcaklıkta ultrasonik su banyosunda bekletilerek hazırlanan P1-A ve P1-B ekstraktları sırasıyla 18 ve 19 mm zon çapları ile benzer sonuçlar verdi (Şekil 4.9).

Farklı ekstraktların (A-G) 1:10 sulandırma oranlarında (P1-10) antibakteriyel etki en fazla P1-E ekstraktı ile gözlemlenirken, P1-G ekstraktı ile inhibisyon zon çapı gözlemlenmedi (Şekil 4.9).

Farklı ekstraktların (A-G) 1:25 sulandırma oranları (P1-25) ile elde edilen sonuçlara göre en etkili sonuçlar, 15 mm zon çapları oluşturan P1-D ve P1-F ekstraktları ile gözlemlenirken, en az etki P1-G ekstraktında 9 mm zon çapı ile belirlendi (Şekil 4.9).

P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlar (A-G) ile *B. cereus* suşu üzerinde elde edilen en yüksek antibakteriyel etki, P1-E ekstraktının sulandırılmadan direkt kullanımı (P1-1) ile elde edildi. P1-E ekstraktının 33.5 mm inhibisyon zon çapı oluşturmamasından dolayı gentamisin antibiyotiğine (34.5 mm, 1 mg/mL) göre anlamlı bir fark belirlenmedi ($p=0.25$).



Şekil 4.9: P1 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P1-1, P1-2, P1-5, P1-10, P1-25) *B. cereus* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri. Her değ er en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata ç ubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.3.2. P2 Metodu ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının *B. cereus* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

P2 metodunun farklı sulandırma oranlarının (Tablo 3.1 ve 3.2) *B. cereus* suşu üzerindeki antibakteriyel etkisi, MHA iç eren petriler üzerinde 100'er µL *B. cereus* kùltürünün yayma ekim yapılmasının ardından petriler üzerinde aç ılan 7 mm ç apındaki kuyulara 40'ar µL olacak şekilde farklı ekstraktlar yük lenerek belirlendi. Uygun inkübasyon sonrası oluş an inhibisyon zon ç apları ölç ülrken kuyuların ç apları (7 mm) ölç üme dahil edildi.

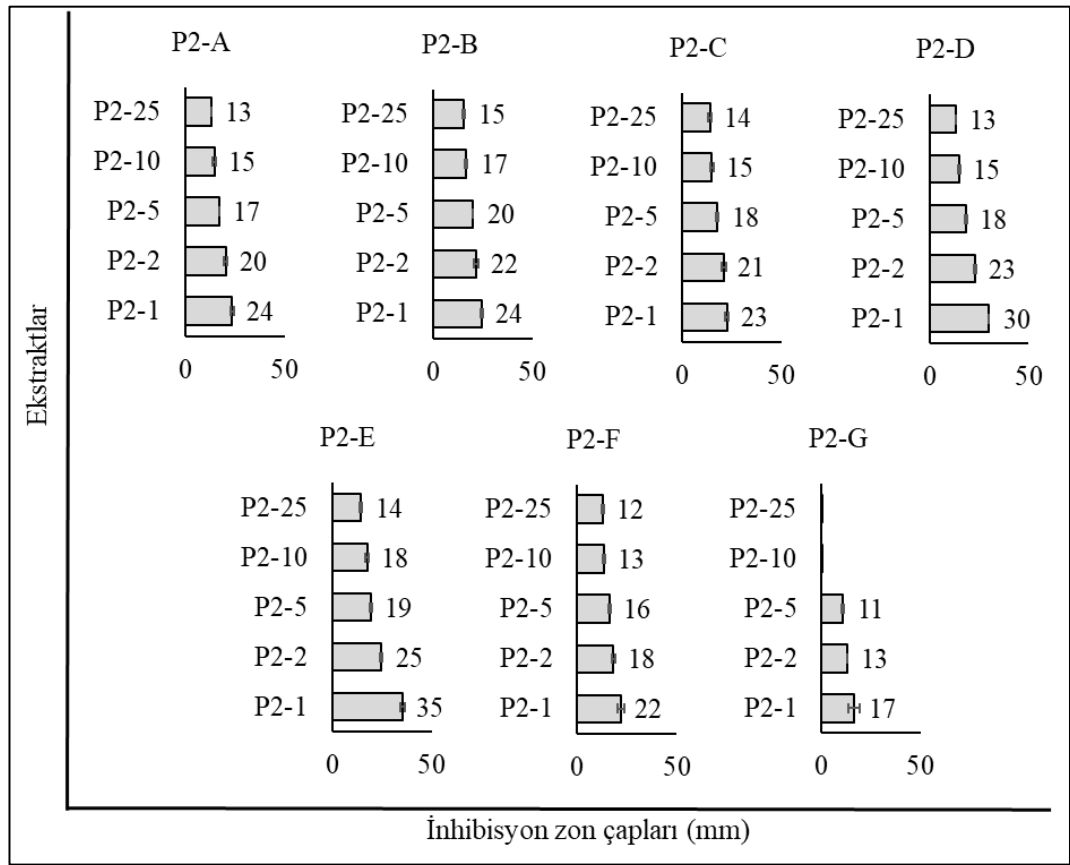
En etkili sonuç, 35 mm zon ç apı ile P2-E ekstraktında belirlenirken; en az antibakteriyel etkili sonuç ise, 17 mm inhibisyon zon ç apı ile sulu ekstrakt (P2-G) ile tespit edildi (Ş ekil 4.10).

P2 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktların (A-G) 1:2 oranında sulandırılmalarından (P2-2) kullanımı ile elde edilen sonuçlara göre, antibakteriyel etki en fazla 25 mm zon çapı ile P2-E ekstraktının kullanımında gözlemlendi. P2-G ekstraktının kullanımında ise 13 mm inhibisyon zon çapı ile en düşük antibakteriyel etki belirlendi (Şekil 4.10).

Farklı ekstraktların (A-G) 1:5 sulandırma oranlarında (P2-5) kullanımı ile elde edilen en etkili sonuç, 20 mm zon çapı ile P2-B ekstraktının kullanımında, en düşük antibakteriyel etki ise P2-G ekstraktının kullanımında 11 mm inhibisyon zon çapı ile gözlemlendi (Şekil 4.10).

Ekstraktların (A-G) 1:10 sulandırma oranlarında (P2-10) en fazla 18 mm zon çapı ile P2-E ekstraktının ve 1:25 sulandırma oranlarında (P2-25) ise 15 mm zon çapı ile P2-B ekstraktının etkili olduğu belirlendi. Ekstraktların P2-5, P2-10 ve P2-25 oranlarında kullanımının *B. cereus* üzerindeki en düşük antibakteriyel etkisi P2-G ekstraktı ile belirlendi (Şekil 4.10).

B. cereus suşu üzerinde P2 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktların (A-G) kullanımından elde edilen sonuçlara göre en etkili sonucu 35 mm ile P2-1 oranında hazırlanan P2-E ekstraktı gösterirken, 33.5 mm zon çapı oluşturan gentamisin antibiyotiği (1 mg/mL) ile P2-E ekstraktı arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p=0.14$).



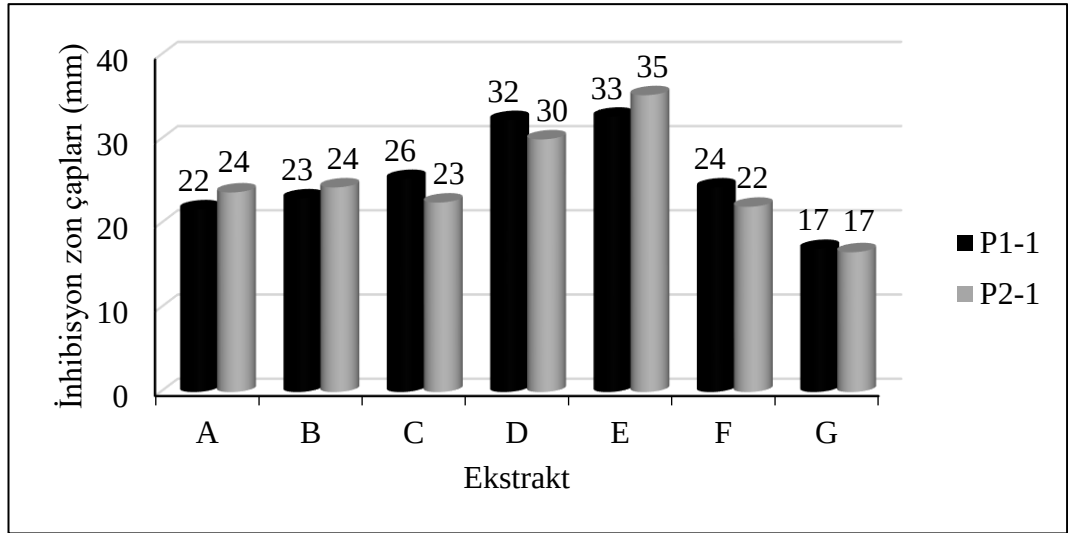
Şekil 4.10: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-1, P2-2, P2-5, P2-10, P2-25) *B. cereus* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri. Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.3.3. P1 ve P2 Metotları ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktlarının Sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) Kullanımlarının *B. cereus* Suşu Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

14 farklı metot ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (Tablo 3.1 ve 3.2) *B. cereus* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri karşılaştırıldı.

Sulandırılmadan direkt olarak kullanılan ekstrakt uygulamalarının (P1-1 ve P2-1) sonuçlarına göre, en çok E ve daha sonra D metotlarının *B. cereus* suşu üzerinde antibakteriyel etkili olduğu belirlendi (Şekil 4.11).

A ve E ekstraktları için P1 metodu ile daha geniş ($p=0.0$ ve $p=0.1$) zon çapları elde edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: P1 ve P2 metotları ile hazırlanan farklı nar atığı ekstraktlarının sulandırılmadan (P1-1 ve P2-1) kullanımlarının *B. cereus* suşu üzerindeki antibakteriyel etkileri. Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.4. *B. subtilis* ve *B. cereus* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri

B. subtilis ve *B. cereus* suşlarının biyofilm oluşumları, 96 kuyulu mikrotitrasyon plağında, 570 nm'deki absorbans değerleri ile bir ELISA cihazı (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) kullanılarak belirlendi. Uygun koşullar altında 48 saatlik inkübasyon sonrası yapılan spektrofotometrik analiz sonucunda, OD 570 nm'deki *B. subtilis* suşunun oluşan biyofilmlerinin absorbans değerleri $0.6 \leq A_{570nm} \leq 1.5$ olarak, *B. cereus* suşunun ise $0.2 \leq A_{570nm} \leq 0.6$ olarak tespit edildi. Buna göre, *B. subtilis* suşunun polistiren yüzeylerde daha güçlü biyofilm oluşturabildiği belirlendi.

4.5. *B. subtilis* Suşunun Biyofilm Oluşumunun Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktları ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması

B. subtilis suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi ve ortadan kaldırılması çalışmalarında denenen ekstraktların 1:5 ve 1:10 (v/v) oranlarında sulandırılarak kullanımı tercih edildi. Ekstraktların sulandırılmamış (P2-1) ve 1:2 (v/v, P2-2) oranlarında sulandırılmış örneklerinin yoğunluğu ve renginin koyuluğundan dolayı

endüstriyel kullanımlarda tercih edilmeyeceği göz önünde bulunduruldu. Bundan dolayı, P2-5 ve P2-10 ekstraktlarının kullanımı tercih edildi.

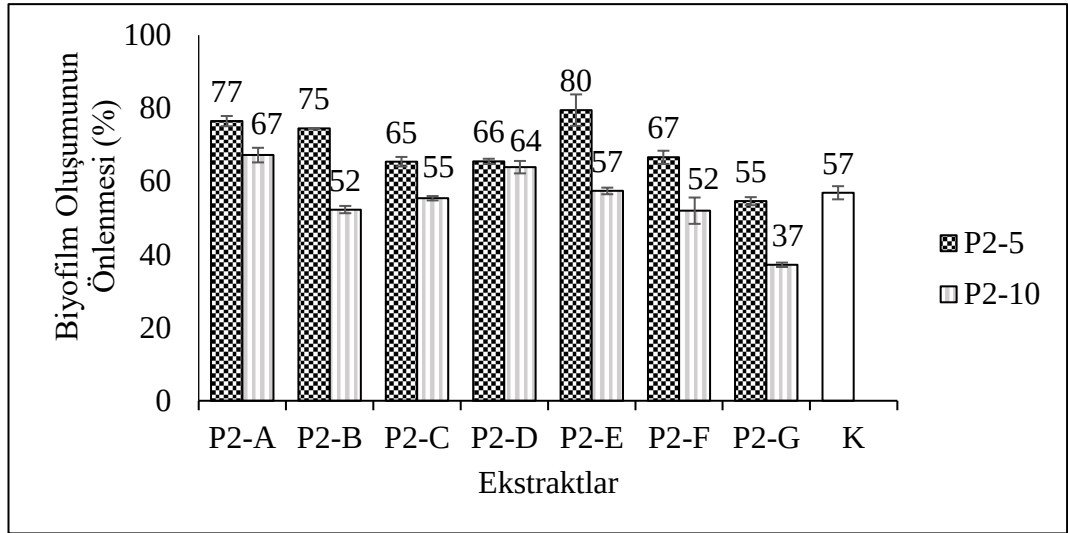
P2 metodu ile hazırlanan farklı nar atığı ekstraktlarının (A-G), P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlara göre içerdikleri elajik asit (P1-C ve P1-D hariç) ve punikalajin miktarlarının (P1-C hariç) daha yüksek olduğu (Şekil 4.1) ve bu ekstraktların daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği belirlendi. Bundan dolayı, biyofilm çalışmalarında, P2 metodu ile elde edilen ekstraktların kullanımı tercih edildi.

4.5.1. *B. subtilis* suşunun Biyofilm Oluşumunun P2 Ekstraktı ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması

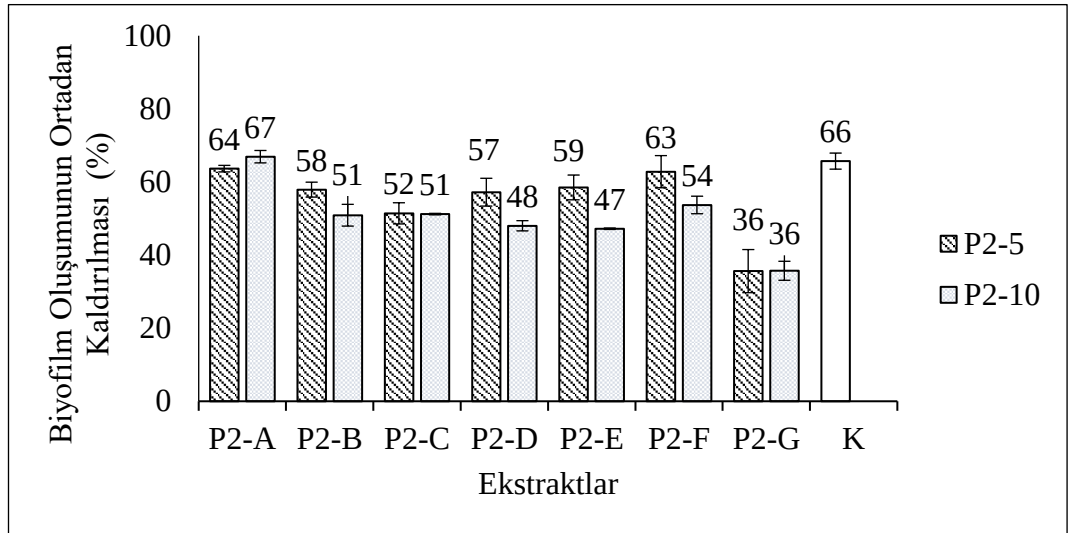
B. subtilis suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi: *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi en fazla P2-E ekstraktı ile %80 oranında gerçekleşti. P2-5 oranında sulandırılarak kullanılan ekstraktların (A-G), %55-80 oranlarında *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunu önlemede etki gösterdiği belirlenirken, bu ekstraktların P2-G hariç %57 oranında biyofilm oluşumunu ortadan kaldıran klor solüsyonuna (K) göre daha etkili oldukları belirlendi (Şekil 4.12).

P2-10 oranında sulandırılarak kullanılan ekstraktların (A-G) %37-67 oranlarında *B. subtilis* biyofilmlerini önledikleri belirlendi. P2-10 sulandırma oranlarında kullanılan ekstraktlar arasında, P2-A (%67) ve P2-D (%64) ekstraktlarının en yüksek etkiyi gösterdikleri ve klora (%57) göre daha etkili oldukları gözlemlendi. (Şekil 4.12). Ekstraktların sulandırma oranlarının artması ile birlikte *B. subtilis* suşunun biyofilmlerinin önlenmesinde daha az etkili oldukları saptandı.

B. subtilis suşunun biyofilm oluşumunun, en etkili bir şekilde P2-A ekstraktının, P2-10 oranı ile %67 oranında ortadan kaldırdığı belirlendi. *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun ekstraktların P2-5 sulandırma oranı ile %36-64 arasında ortadan kaldırdığı ancak klora göre (%66) daha zayıf etkiye sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.13). P2-10 oranında sulandırılarak kullanılan ekstraktlar ile de, P2-A ekstraktı (%67), klora (%66) göre daha etkili olurken, P2-10 oranında sulandırılarak kullanılan diğer ekstraktlar (B-G) %36-54 *B. subtilis* biyofilmlerini ortadan kaldırarak klora göre daha zayıf etkili oldukları belirlendi (Şekil 4.13). Ekstraktların sulandırma oranlarının artması ile birlikte, *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun giderilmesinde ekstraktların etkisinin azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.12: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10), *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi üzerindeki etkisi (%) (K: Klor solüsyonu). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.13: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10), *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması üzerindeki etkisi (%) (K: Klor solüsyonu). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.6. *B. cereus* Suşunun Biyofilm Oluşumunun Farklı Yöntemler ile Hazırlanan Nar Atığı Ekstraktları ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması

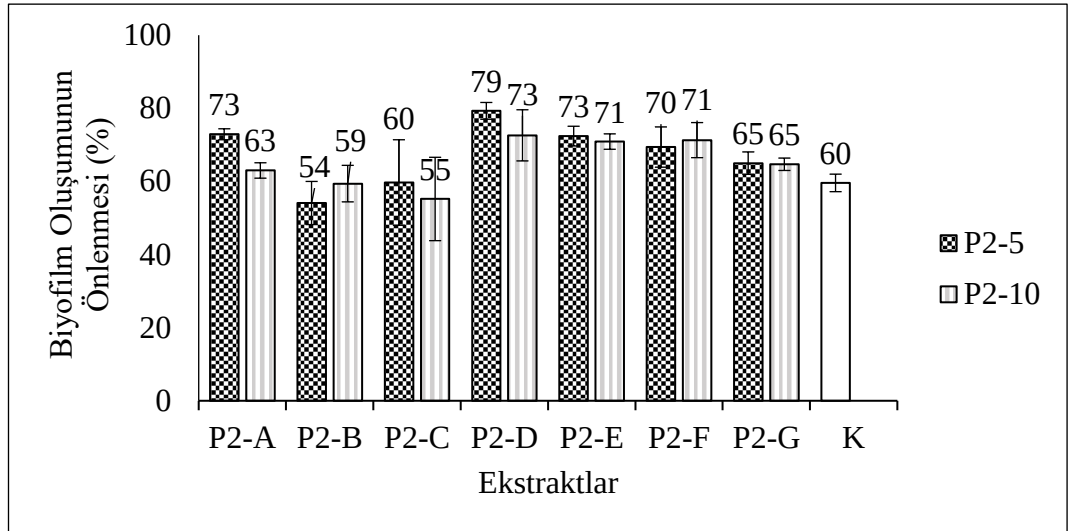
B. cereus suşunun biyofilm oluşumunun önleme ve ortadan kaldırma çalışmalarında, denenen ekstraktların 1:5 (P2-5, v/v) ve 1:10 (P2-10, v/v) oranlarında sulandırılarak kullanıldı.

P2 metodu ile elde edilen ekstraktların (A-G) P1 metodu ile elde edilen ekstraktlara oranla daha yüksek miktarlarda fenolik bileşik içerdiği ve bu ekstraktların daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Bundan dolayı, biyofilm çalışmalarında P2 metodu ile elde edilen ekstraktların kullanımı tercih edildi.

4.6.1. *B. cereus* suşunun Biyofilm Oluşumunun P2 Ekstraktı ile Önlenmesi ve Ortadan Kaldırılması

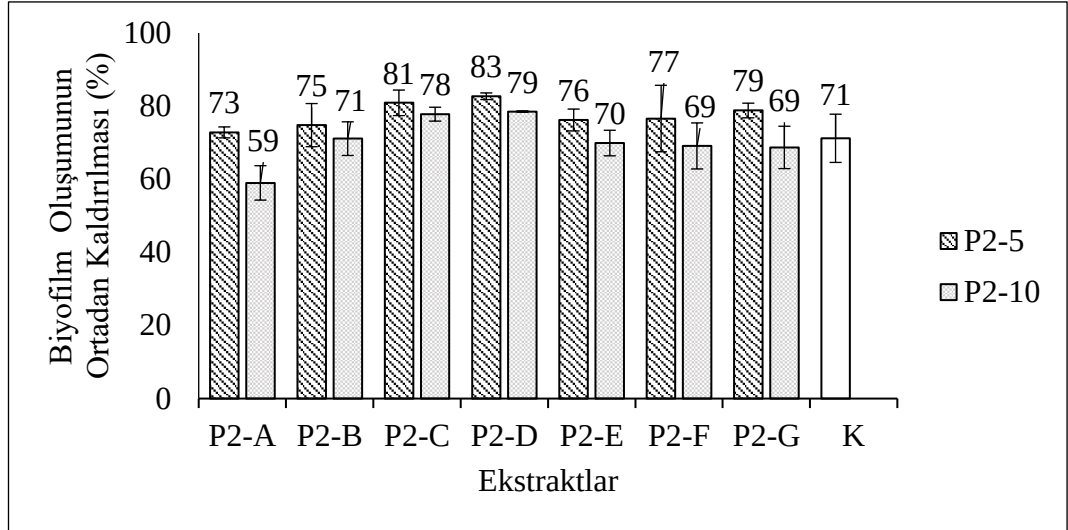
B. cereus suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi: *B. cereus* suşunun biyofilmlerinin oluşumunun önlenmesinde en etkili sonuç, %79 önleme gösteren P2-E ekstraktının P2-5 oranında sulandırılarak kullanılması ile elde edildi. *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun klor solüsyonu ile %60 oranında önlendiği, P2-5 sulandırma oranları kullanılarak uygulanan ekstraktlar ile de %54-79 oranları arasında önlendiği belirlendi. Klora göre daha yüksek sonuç veren bu ekstraktlar arasında en yüksek etki (%79) P2-D ekstraktı ile belirlendi. En düşük etki ise klora göre daha zayıf etki gösteren P2-B ekstraktı ile belirlendi (Şekil 4.14).

P2-10 oranlarında sulandırılarak kullanılan ekstraktların (A-G) *B. cereus* biyofilmlerini %55-73 oranlarında önledikleri belirlendi. Klora göre (%60) daha etkili sonuçları veren ekstraktlar arasında en yüksek etki (%73) P2-D ile gözlemlendi. En düşük etkiyi gösteren P2-B (%59) ve P2-C (%55) ekstraktlarının klora göre daha zayıf etkiye sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10), *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesi üzerindeki etkisi (%) (K: Klor solüsyonu). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

B. cereus suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması: *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılmasında, ekstraktların P2-5 oranında sulandırılarak kullanımı ile %73-83 arasında etkili oldukları gözlemlenirken, bu ekstraktların klora (%71) göre daha etkili bir şekilde biyofilm oluşumunu ortadan kaldırdıkları belirlendi (Şekil 4.15). P2-10 oranında hazırlanan ekstraktların ise *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunu %59-79 oranlarında ortadan kaldırdığı belirlendi. P2-D (%79) ve P2-C (%78) ekstraktlarının klora göre daha yüksek etkiye sahip olduğu belirlenirken, en düşük etki P2-A (%59) ekstraktı ile belirlendi. Ekstraktların sulandırma oranlarının artması ile birlikte *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesindeki etkisinde belirgin bir azalmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının (A-G) farklı sulandırma oranlarının (P2-5 ve P2-10), *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması üzerindeki etkisi (%) (K: Klor solüsyonu). Her değer en az üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, ülkemizde kolay ve bol miktarda üretimi yapılan Hicaz narının, meyve suyu işleme sanayinde oluşan atık kısımlarından biyoaktif bileşiklerin farklı ekstraksiyon metotları ile eldesi ve elde edilen ekstraktların *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu kapsamda;

- Farklı oranlarda Hicaz narı atığı tozu (P1, 1:10; P2, 1:20; w/v),
- Farklı çözücüler (A: etanol-120 dakika, B: etanol-30 dakika, C: metanol, D: etanol ve HCl, E: metanol ve HCl, F: aseton, G: su) ve
- Farklı ekstraktların farklı sulandırma oranları (1:2, 1:5, 1:10, 1:25) kullanılarak denemeler yapılmıştır.

Bu doğrultuda, öncelikle nar tozu miktarının, farklı çözücüler kullanıldığında elde edilen ekstraktların içeriklerine olan etkileri araştırılmıştır. Bunun için de, farklı oranlarda (P1 ve P2) nar tozu içeren ekstraktlar hazırlanmıştır. Daha sonra kullanılan farklı çözücülerin (A-G), elde edilen ekstraktların içerikleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Ayrıca elde edilen ekstraktların hangi konsantrasyonda en fazla antibakteriyel ve antibiyofilm etkiye sahip olduklarını belirlemek için de farklı sulandırma oranları kullanılmıştır. Ekstraksiyon yöntemleri arasında, çözücü olarak etanol kullanıldığında; P1 ve P2 metotları ile hazırlanan nar atığı karışımlarının aynı sıcaklıkta, farklı iki süre (30 dakika ve 120 dakika) ile ultrasonik su banyosunda ekstraksiyonunun yapılması ile fiziksel parçalama süresinin elde edilen nar atığı ekstraktlarının içerikleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

Elde edilen ekstraktların içeriklerinin belirlenmesinde ise TLC ve HPLC metotları kullanılmıştır.

Ekstraktların içerdiği fenolik bileşikler, TLC ve HPLC analizleri ile araştırılmıştır. Ayrıca, TLC uygulamasıyla fenoliklerin belirlenmesinde en etkin görüntünün eldesi için 8 farklı yürütücü faz (MP1-MP8) incelenmiştir. Bunlar arasından en iyi görüntülemenin MP5 (Yürütücü faz 5) metodu (EtAs: GA: FA: Ds, 100:11:11:10, v/v) ile sağlandığı belirlenmiştir.

Türkyılmaz ve arkadaşları (2017) tarafından farklı nar kısımlarının ekstraksiyonu için aseton, metanol, etanol ve su kullanıldığında en yüksek fenolik madde ve antioksidan

miktarlarını %70 aseton çözeltisi ile elde etmişlerdir. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da çözücü olarak %70 aseton kullanımının P1 metodu ile hazırlanan ekstraktlardan fenolik bileşik eldesinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, P2 metodu ile farklı çözücüler (A-G) kullanılarak hazırlanan ekstraktlar arasında ise punikalajin ve elajik asit miktarları en fazla P2-D (etanol ve %37'lik HCl içeren) ekstraktında belirlenmiştir.

Ekstraksiyon süresinin etkisinin belirlenmesi için, 50°C'deki ultrasonik su banyosunda farklı ekstraksiyon süreleri ile hazırlanan P1-A ve P2-A (120 dakika) ile P1-B ve P2-B (30 dakika) ekstraktlarıyla değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; punikalajin miktarı P1 metodu kullanıldığında en fazla P1-B (%2) ile, P2 metodu kullanıldığında ise en fazla P2-A (%11) ile elde edilmiştir. Elajik asit miktarında ise P1 metodu kullanıldığında en fazla (%3.1) P1-A ile, P2 metodu kullanıldığında ise en fazla (%11.4) P2-A ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ultrasonik su banyosunda ekstraksiyon süresinin artırılması ile fenolik bileşiklerin miktarlarında belirgin ve anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Bu nedenle, endüstriyel kullanımlar için en uygun ekstraksiyon süresinin 30 dakika olarak önerilebileceği belirlenmiştir.

HPLC analiz yöntemi ile belirlenen fenolik bileşiklerin miktarları özetle, punikalajin miktarının genellikle P2 ekstraktlarında P1 ekstraktlarına göre (P1-C hariç) daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde elajik asit miktarında yine P2 ekstraktlarında P1 ekstraktlarına göre (P1-C ve P1-E hariç) daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Buna göre, nar tozuna eklenen çözücü miktarının artması ile daha fazla fenolik bileşiğin açığa çıktığı belirlenmiştir.

Ekstraktların organik asit içeriklerinin belirlenmesi için kullanılan HPLC sonuçlarına göre; en fazla malik asit içeriği, P2-E (%3.2) ekstraktı ile, en fazla sitrik asit içeriği ise P2-D (%1.1) ekstraktı ile tespit edilmiştir (Tablo 5.1). Böylece, organik asit miktarlarının P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda P1 metodu ile hazırlananlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Buna göre, yine fenolik bileşiklerde olduğu gibi organik asitlerin ekstraktlardan eldesinde daha az nar tozunun kullanımının nar tozunun çözücü ile daha etkin bir şekilde teması ile daha etkili olabildiği ön görülmüştür.

Tablo 5.1: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasından (A-G) en fazla miktarda fenolik bileşik ve organik asit içeren ekstraktlar.

	Fenolik Bileşikler		Organik Asitler	
	Punikalajin	Elajik asit	Malik Asit	Sitrik Asit
P1	P1-F (%7.3)	P1-F (%11.3)	P2-E (%0.9)	P1-D (%0.9)
P2	P2-D (%14)	P2-D (%17.2)	P2-E (%3.2)	P2-D (%1.1)

P1 ve P2 metotları ile hazırlanan farklı ekstraktlar (A-G) arasında, *B. subtilis* üzerindeki en yüksek antibakteriyel etki P1-E (34 mm) ve P2-E (36 mm) ekstraktlarının sulandırılmadan direkt olarak kullanılması (P1-1 ve P2-1) ile elde edilmiştir (Tablo 5.2). P1 ve P2 metotları ile elde edilen nar atığı ekstraktlarında sulandırma artışı ile birlikte oluşturdıkları inhibisyon zon çaplarında düşüşün gerçekleştiği belirlenmiştir.

P1 ve P2 metotları ile hazırlanan farklı ekstraktlar (A-G) arasında, *B. cereus* üzerindeki en yüksek antibakteriyel etki yine P1-E (33 mm) ve P2-E (35 mm) ekstraktlarının P1-1 ve P2-1 oranları ile elde edilmiştir (Tablo 5.2). *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkide de, *B. subtilis*'te gözlemlendiği gibi, ekstraktların sulandırılma oranları arttıkça azalma görülmüştür.

Tablo 5.2: Farklı ekstrakt metotları (P1 ve P2) kullanılarak hazırlanan nar atığı ekstraktlarının *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerindeki belirlenen en yüksek antibakteriyel etkileri (mm).

	Antibakteriyel Etki	
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
P1	P1-E, P1-1 (34 mm)	P1-E, P1-1 (33 mm)
P2	P2-E, P2-1 (36 mm)	P2-E, P2-1 (35 mm)

Çalışmada, farklı oranlarda karıştırılan (P1 ve P2) ve farklı yöntemler ile elde edilen nar atığı ekstraktlarının (A-G) fenolik bileşik (punikalajin ve elajik asit) ve

organik asit (malik asit ve sitrik asit) içeriklerinin miktarları belirlenmiştir. Fenolik bileşik ve organik asit içeriklerinin P2 metodu ile hazırlanan ekstraktlarda miktarca daha zengin olduğu, *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde en yüksek antibakteriyel etkilerin de P2 ekstraktları ile elde edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, nar atığı ekstraktlarının *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerindeki antibiyofilm etkilerinin denemelerinde, P2 metodu ile hazırlanan ekstraktların kullanımı tercih edilmiştir. Ayrıca, biyofilm çalışmalarında denenen ekstraktların 1:5 (P2-5, v/v) ve 1:10 (P2-10, v/v) oranlarında sulandırılmış örneklerinin kullanımı tercih edilmiştir. Bunun sebebi, ekstraktların sulandırılmamış direkt hallerinin (P2-1) koyu renkli olması ve endüstriyel kullanımlarda uygun olmamasıdır. Ayrıca, endüstriyel kullanımlarda en düşük maliyet ile en etkili çözüme ulaşmak esas alındığı için daha fazla sulandırılmış ve renk koyuluğu göstermeyen P2-5 ve P2-10 ekstraktlarının kullanımı tercih edilmiştir.

Hazırlanan ekstraktların antibiyofilm etkileri değerlendirildiğinde, P2 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktlar (A-G) ile *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun önlenmesinde en yüksek etki, P2-E (%80) ekstraktının P2-5 oranında sulandırılarak kullanımı ile elde edilmiştir. P2 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktlar (A-G) ile *B. subtilis* suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılmasında ise, en fazla P2-10 oranında sulandırılarak kullanılan P2-A (%67) ekstraktının etkili olduğu görülmüştür (Tablo 5.3).

P2 metodu ile hazırlanan farklı ekstraktlar (A-G) arasında *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun en fazla (%79) P2-5 oranında sulandırılarak kullanılan P2-D ekstraktı ile önlendiği, *B. cereus* suşunun biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılmasında ise en fazla antibiyofilm etkinin (%83) P2-5 oranında sulandırılarak kullanılan P2-D ekstraktı ile tespit edilmiştir (Tablo 5.3).

Tablo 5.3: P2 metodu ile hazırlanan nar atığı ekstraktlarının *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerindeki belirlenen en yüksek antibiyofilm etkileri (%).

Antibiyofilm Etki				
Biyofilm Oluşumunu Önleme		Biyofilm Oluşumunu Ortadan Kaldırma		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
P2	P2-E, P2-5 (%80)	P2-D, P2-5 (%79)	P2-A, P2-10 (%67)	P2-D, P2-5 (%83)

Bu tez çalışmasındaki sonuçlar doğrultusunda, kullanılan farklı ekstraktlar arasında özellikle P2-E ekstraktının, ardından P2-D (etanol-asit), P2-A (etanol) ve P2-C (metanol) ekstraktlarının gıda patojeni olan Gram pozitif *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde oldukça güçlü antibakteriyel etki ve polistiren yüzeyler üzerinde de güçlü antibiyofilm etki gösterdikleri belirlenmiştir.

P2-E ekstraktının sulandırılmadan direkt kullanımı ile *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde gözlemlenen antibakteriyel etkileri, gentamisin antibiyotiğine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu da elde ettiğimiz ekstraktlardaki biyoaktif bileşiklerin antibakteriyel etkisinin önemini göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar ile, nar atığı ekstraktlarının doğal bir antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olarak kullanılabileceğini ve endüstride sıklıkla kullanılan dezenfektanlara göre iyi bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Endüstride biyofilm oluşumunun giderilmesi için sıklıkla klor (200ppm) kullanılmaktadır. Klor bileşikleri; glukoz metabolizmasında görev alan enzimleri inhibe edici ve hücrel proteinleri okside edici özelliklere sahiptir. Bu bileşikler, membran proteinleri ve lipidler ile etkileşime geçerek membran geçirgenliğinin artmasına sebep olmaktadır [Ghandbari et al., 1983], [Noss et al., 1983], [Virto et al., 2005]. Fakat endüstride dezenfeksiyon işleminde yaygın olarak kullanılan bu bileşikler, sudaki organik maddeleri oksitleyerek kanserojenik trihalometanları ve haloasetik asitleri oluşturabildiklerinden dolayı biyofilm kontrolünde alternatif ve güvenilir yeni doğal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır [Sadiq and Rodriguez, 2004], [Gomez-Lopez et al., 2013], [Van Haute et al., 2013], [Waters and Hung, 2014]. Doğal antibakteriyel ve antibiyofilm ajanı olarak etkili bir alternatif sunan fenolik bileşiklerin ve organik asitlerin etkilerini pH'ı düşürmeleri, makromoleküllerin sentezinin ve hücre membran transport sisteminin aksamalarına sebep olmaları gibi

birtakım reaksiyonlar sayesinde sağladıkları belirtilmektedir [Ricke, 2003], [Neal-McKinney at al., 2012], [Ramos-Villarroel et al., 2015]. Bu sebeple, fenolik bileşikler ve organik asitler, yaygın olarak kullanılan klorlu bileşiklere iyi birer alternatif sunmaktadır. Bu çalışmada yapılan biyofilm denemelerinde, elde ettiğimiz nar atığı ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleme ve ortadan kaldırmada özellikle P2-D ve P2-E ekstraktlarının, kullanılan 200 ppm klor solüsyonuna göre daha etkili sonuç verdikleri belirlenmiştir.

Bugüne kadar nar atığı ekstraktları ile yapılan güncel çalışmalarda, farklı nar atığı ekstraktlarının *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin incelendiği bilinen bir çalışma henüz mevcut değildir. Ceylan ve Alıc (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, etanol ekstraktı ile elde edilen *Allium orientale* (doğu soğanı) ekstraktının *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun biyofilm oluşumunu 31.63 ± 5.49 oranında önlediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, etanol ile hazırlanan nar atığı ekstraktları ile *B. subtilis* ve *B. cereus* suşlarının biyofilm oluşumlarının %80'a varan oranlarda önlediği belirlenmiştir. Türkyılmaz ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada; metanol, etanol, su ve aseton kullanılarak elde edilen nar ekstraktlarında fenolik bileşik içeriği olarak, bizim çalışmamızda da belirlendiği gibi, punikalajin ve elajik asit içerikleri belirlenmiştir. Türkyılmaz ve arkadaşları tarafından denenen nar ekstraktlarının *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisinin 20.19 ± 0.33 mm, *B. megaterium* üzerinde ise 13.32 ± 0.32 mm olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, metanol ile elde edilen nar atığı ekstraktları ile *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerinde 20 mm'yi geçen inhibisyon zon çapları gözlemlenmiştir. Ayrıca, metanol ve asit karışımı kullanılarak elde edilen ekstraktımız ile gözlemlenen antibakteriyel etkinin, sadece metanol kullanılarak hazırlanan ekstraktlara göre %80'e varan oranlarda artış gösterdiği belirlenmiştir. Yine metanol-asit kullanılarak elde edilen ekstraktın, sadece metanol kullanılarak elde edilen ekstrakt kadar antibiyofilm etkiye sahip olduğu hatta bazı ekstrakt uygulamalarında %15'e varan oranlarda artış gösterdiği belirlenmiştir.

Al-Zoreky (2009) tarafından nar ekstraktının antibakteriyel etkisi ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, su kullanılarak elde edilen nar ekstraktlarının *B. subtilis* üzerindeki antibakteriyel etkisinin 15 mm inhibisyon zon çapı şeklinde belirlendiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da, su kullanılarak elde edilen ekstrakt ile *B. subtilis* üzerinde 15 mm ve *B. cereus* üzerinde 17 mm inhibisyon zon çapları tespit

edilmiştir. Bu sebeple, su kullanılarak hazırlanan nar atığı ekstraktımızın benzer şekilde Al-Zoreky tarafından yapılan çalışmada kullanılan ekstrakt kadar etkili olduğu belirlenmiştir.

Türkyılmaz ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan aynı çalışmada, aseton ve etanol kullanılarak nar ekstraktları elde edilmiş ve bu ekstraktların aseton kullanılarak hazırlanması ile *S. aureus* üzerinde 20.40 ± 0.30 mm, *B. megaterium* üzerinde 14.40 ± 0.29 mm antibakteriyel etki gösterdiği, ekstraktlar etanol kullanılarak hazırlandığında ise *S. aureus* üzerinde 19.77 ± 0.36 mm, *B. megaterium* üzerinde de 14.06 ± 0.21 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise; ekstraktlar aseton kullanılarak hazırlandığında, *B. subtilis* üzerinde 22 mm ve *B. cereus* üzerinde 17 mm inhibisyon zon çapları oluşturduğu, etanol ile ekstrakt hazırlandığında ise, *B. subtilis* üzerinde 23 mm, *B. cereus* üzerinde de 24 mm'ye varan inhibisyon zon çapları oluşturduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı, bu çalışmada hazırlanan ekstraktların oldukça daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Etanol ve asit karışımı kullanılarak elde edilen ekstraktımızda ise antibakteriyel etkinin, sadece etanol kullanılarak hazırlanan ekstraktlara göre %45'e varan oranlarda artış gösterdiği ancak antibiyofilm etkide etanol-asit kullanılarak hazırlanan ekstraktın etkisinde, sadece etanol kullanılarak hazırlanan ekstrakta göre bir artışın gözlemlenmediği belirlenmiştir.

Daha önceden yapılan çalışmalarda, fenolik bileşiklerin (punikalajin ve elajik asit) ve organik asitlerin (sitrik asit ve malik asit) antibiyofilm etkilerinin *S. aureus* üzerinde %100'e varan oranlarda, *E. coli* suşunun biyofilm oluşumunda ise %85'e varan oranlarda etki gösterdikleri belirtilmiştir (Tablo 5.5). Bu verilerden yola çıkarak, bu tez çalışmasında, nar ekstraktları ile belirlenen antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerin, TLC ve HPLC yöntemleri ile tanımlayabildiğimiz veya tanımlayamadığımız fenolik bileşik ve/veya organik asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, nar atığı ekstraktlarının, *B. subtilis* ve *B. cereus* suşları üzerindeki belirlenen antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri ile içerdiği punikalajin, elajik asit, malik asit ve sitrik asitin varlıkları ve özellikle miktarları arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmemiştir.

Tablo 5.4: Punikalajin, elajik asit, sitrik asit ve malik asitin çeşitli çalışmalarda belirlenen antibiyofilm etkileri.

Bileşik	Antibiyofilm etki	Kaynaklar
Punikalajin	<i>S. aureus</i> suşunun biyofilm oluşumunu %47-90 önleme	Xu et al., 2017
Elajik asit	<i>S. aureus</i> suşunun biyofilm oluşumunu %45-100 önleme, <i>E. coli</i> suşunun biyofilm oluşumunu %10- 85 önleme	Bakkiyaraj et al., 2013
Sitrik asit	<i>E. coli</i> suşunun biyofilm oluşumunu %80-86 önleme, %47-64 giderme	Akbaş, 2017
Malik asit	<i>E. coli</i> suşunun biyofilm oluşumunu %52-68 önleme, %39-59 giderme	Akbaş, 2017

Serbest halde bulunan mikroorganizmaların kullanılan dezenfektanlara veya antibiyotiklere karşı biyofilm içerisinde bulunduklarından daha hassas oldukları bilinmektedir [Stewart and Costerton 2001], [Hoiby et al. 2010]. Bu ekstraktların serbest haldeki mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etki sağlamanın yanı sıra önlenmesi ve ortadan kaldırılması oldukça zor olan biyofilm oluşumları üzerinde de antibiyofilm etkiye sahip olması çok önemlidir. Bu sebeple, bu tez çalışmasında nar atıklarından elde ettiğimiz ekstraktların antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri üzerine durulmuş ve elde edilen sonuçlara göre ekstraktların etkili olduğu belirlenmiştir.

Nar kabuğu ekstraktlarının toksik olmayan, ucuz ve kolayca hazırlanabilir korozyon inhibitörleri olarak etkili bir şekilde kullanılabileceği de belirtmiştir [Ashassi-Sorkhabi et al., 2015]. Bu etkinin açıklamasında ise, ekstraktların içerdiği organik asitlerin yüzeylerde pasif film oluşturabildiği, böylece inhibitör molekül görevi yaparak korozyonu önleyebileceklerini belirtmiştir. Bu da, bu ekstraktların gıda endüstrisinde ekipmanlara zarar vermeden kullanılabileceğini göstermektedir.

İleriki çalışmalarda, P2-E ekstraktının birden fazla bakteri suşundan oluşan karışık kültürlerin oluşturduğu biyofilm üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmelidir. Ayrıca, bu ekstraktların Gram negatif bakteriler üzerinde de etkileri

denenmelidir. Bu çalışmada, polistiren yüzeyde oldukça etkili olan bu ekstraktın (P2-E), gıda endüstrisinde çokça kullanılan farklı yüzeyler (çelik, cam, teflon gibi) üzerindeki etkilerinin incelenmesi de endüstriyel kullanım açısından önemlidir. Ayrıca endospor oluşturan *Bacillus* cinsleri gibi çeşitli bakterilerin sporlarının ortadan kaldırılmasında bu ekstraktın etkisinin araştırılması da önemli bir araştırma konusudur.

Bu tez çalışmasında, nar atığı tozundan farklı metotlarla hazırlanan ekstraktların endüstriyel ölçekte kullanılabilirliğinin araştırılması önemlidir. Hazırlanan antibakteriyel etkili ekstraktlar başta gıda koruyucusu olarak birçok alanda kullanılabilirler. Ayrıca endüstride kullanılan kimyasal antibiyofilmler ajanlara iyi bir alternatif olabilirler. Bu nedenle, çalışmalardan elde edilen sonuçlar, Türk ve Dünya bilimine ilgi çekici veriler kazandıracaktır. Ek olarak, gıda sanayinde insan ve çevre sağlığını tehlikeye sokan toksik kimyasallara alternatif doğal antibakteriyellerin kullanımına önemli katkılarda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- Abacı Z. T., Sevindik E., (2014), “Ardahan Bölgesinde Yetiştirilen Elma Çeşitlerinin Biyoaktif Bileşiklerinin ve Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi”, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 24 (2), 175-184.
- Adams L.S., Seeram N.P., Aggarwal B.B., Takada Y, Sand D., Heber D., (2006), “Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells”. Journal of Agricultural Food Chemistry, 54, 980–985.
- Akan E., Kınık Ö., (2014), “Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi”, Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science – Technology, 14, 42-51.
- Akbaş M.Y., (2017), “Effectiveness of Organic Acid Treatments for Inhibition and Removal of *E. coli* Biofilms”, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 44, 1, 35-45.
- Altemimi A., Watson D.G., Kinsel M., Lightfoot D.A., (2015), “Simultaneous extraction, optimization, and analysis of flavonoids and polyphenols from peach and pumpkin extracts using a TLC-densitometric method”, Chemistry Central Journal, 9 (39).
- Al-Zoreky N.S., (2009), “Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels”, International Journal of Food Microbiology, 134 (3), 244-248.
- Ashassi-Sorkhabi H., Mirzaee S., Rostamikia T., Bagheri R., (2015), “Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract as a Green Corrosion Inhibitor for Mild Steel in Hydrochloric Acid Solution”, International Journal of Corrosion, 2015, 1-6.
- 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.
- Başkaya R., Karagöz A., Keskin Y., (2009), “Gıda Sanayinde Temizlik ve Dezenfeksiyon”, TAF Preventive Medicine Bulletin, 8(1), 83-96.
- Baumgartner J. C., Siqueira J. F., Sedgley C. M., Kishen A. N. I. L., (2008), “Microbiology of endodontic disease”, Ingle’s Endodontics, 6, 221-308.
- Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf K, Zehnder A.J.B., (1993), “Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids”, Applied and Environmental Microbiology, 59, 3973–3977.
- Bulinski R, Marzec Z, Koktycz N., (1988), “Determination of iodine in milk and milk products”, Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny, 39, 198-202.

Cetin-Karaca H., Newman M.C., (2015), “Antimicrobial Efficacy of Natural Phenolic Compounds against Gram Positive Foodborne Pathogens”, *Journal of Food Research*, 4 (6), 14-27.

Ceylan O., Alic H., (2015), “Antibiofilm, Antioxidant, Antimutagenic Activities and Phenolic Compounds of *Allium orientale* BOISS”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58 (6), 935-943.

Characklis W.G., Marshal K.C., (1990), “Biofilms”, John Wiley and Sons, New York.

Characklis W.G., Wilderer P.A., (1989), “Structure and function of biofilms, In *Structure and Function of Biofilms.*”, John Wiley and Sons, 369–371.

Chmielewski R.A.N., Frank J.F., (2003), “Biofilm formation and control in food processing facilities”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22-32.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott, H.M., (1995), “Microbial biofilms”, *Annual Review of Microbiology*, 49,711–745.

Çöl B.G., Aksu H., (2017), “*Bacillus cereus* Kaynaklı Gıda Zehirlenmeleri”, *Türkiye Klinikleri, Journal of Food Hygiene and Technology-Special Topics*, 3 (3), 245-51.

Davey M.E., O'toole G.A., (2000), “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 847-867.

Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P., (1998), “The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm”, *Science*, 280, 295–298.

Dong Y.H., Zhang L.H., (2005), “Quorum sensing and quorum-quenching enzymes”, *The Journal of Microbiology*, 43, 101–109.

Dong Y.H., Wang L.H., Xu J.L., Zhang H.B., Zhang X.F., Zhang L.H., (2001), “Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserinelactonase”, *Nature*, 411, 813–817.

Dong Z., Hu Q., Guo S., Zhao G., Du B., Liu X., (2008), “Optimization of technology for extracting antibacterial substances from pomegranate peel”, *Nongye Gong- cheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 24 (3), 274-277.

Donlan R.M., (2002), “Biofilms: microbial life on surfaces”, *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881-890.

Dornseiffen J.W., (1998), “Residue aspects of disinfectants used in the food industry”. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 309-312.

Elfalleh W., Hannachi H., Tlili N., Yahia Y., Nasri N., Ferchichi A., (2012), "Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower", *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (32), 4724-4730.

El-Nemr S.E., Ismail I.A., Ragab M., (2006), "Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit", *Die Nahrung*, 34 (7), 601–606.

Flemming H.C., Wingender J., Mayer C., Körstgens V., Borchard W., (2000), "Cohesiveness in biofilm matrix polymers", In *Symposia-Society for General Microbiology*, 87-106. Cambridge, Cambridge University Press, 1999.

Fletcher M, Loeb G.I., (1979), "Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces", *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 67–72.

Freter R., Gingell D., Jones G.W., Mutter P.R., Dazzo F.B., (1984), "Mechanisms of adhesion". In: K.C. Marshal, Editor, "Microbial adhesion and aggregation", Springer, Verlag.

Fritze D., (2004), "Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria". *The American Phytopathological Society*, 9 (11), 1245-1248.

Furneri P.M., Marino A., Saija A., Uccella N., Bisignano G., (2002), "In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20 (4), 293-296.

Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z., (2008), "Bacterial adhesion and biofilms on surfaces". *Progress in Natural Science*, 18,1049–1056.

Ghandbari E.H., (1983), "Reactions of Chlorine and Chlorine Dioxide with Free Fatty 319 Acids, Fatty Acid Esters, and Triglycerides", *Water Chlorination: Environmental Impact 320 and Health Effects*, Vol. 4 (RL Jolley et al, editors), Ann Arbor Science Publishers, 1, 19.

Glazer I, Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, Amir R., (2012), "Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60, 4841–4848.

Gómez-López V.M., Marín A., Medina-Martínez M.S., Gil M.I., Allende A., (2013), "Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach", *Postharvest Biology and Technology*, 85, 210-217.

Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.N., Smith N.R., (1973), "The genus *Bacillus*". *US Department of Agriculture Handbook*, (427), 109-126.

Granum P.E., Lund T., (1997), "*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins", *FEMS Microbiology Letters*, 157 (2), 223–228.

Growther L., Sukirtha K., Savitha N., Niren Andrew S., (2012), “Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Extracts Against Shiga Toxin Producing *E. coli*”, International Journal of Life Sciences Bitechology and Pharmaceutical Research, 1 (4), 164-172.

Gundogdu M., Yilmaz H., (2012), “Organic acid , phenolic profile and antioxidant capacities of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars and selected genotypes”, Scientia Horticulture, 143, 38-42.

Gün İ., Ekinci F.Y., (2009), “Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. Derleme / Review”. Gıda, 34 (3), 165-173.

Güngörmez H., (2015), “Doğal Boyalar ve Tuz, Derleme Makalesi / Review Article” Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 5 (1), 57-63.

Güvensen N.C., Ekmekcioğlu S., (2016), “Biyofilm Kontrolünde Biyositler ve Etki Tarzları”. OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 14 (1), 1-19.

Hayrapetyan H, Hazeleger W.C., Beumer R.R., (2012), “Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures”. Food Control, 23 (1), 66-72.

Hepdeniz Ö.K., Seçkin Ö., (2017), “Dinamik Mikrobiyal Bir Yaşam: Oral Biyofilm/ A Dynamics Microbial Life: Oral Biofilm”, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8 (3), 47-55.

Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O., (2010), “Antibiotic resistance of bacterial biofilms”. International Journal of Antimicrobial Agents. 35, 322–332.

Houry A., Briandet R., Aymerich S., Gohar, M., (2010), “Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation”, Microbiology, 156, 1009–1018.

Hughes N.M., Neufeld H.S., Burkey K.O., (2005), “Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*”, New Phytologist, 168, 575-587.

Ibrahim, M.I., (2010), “Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents”, World Journal of Agricultural Sciences, 6 (4), 338-344.

İkinci A., Kılıç M.E., (2016), “Siverek (Şanlıurfa) Yöresinde Yetiştirilen Yerel Nar (*Punica granatum* L.) Genotiplerinin Bazı Pomolojik ve Kimyasal Özellikleri”. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 26 (4), 556- 562.

Jahfar M., Vijayan K.K., Azadi P., (2003), “Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*”. Research Journal of Chemistry and Environment, 7, 43-50.

Joy G.S., George P., (2014), “Antimicrobial screening of Alfalfa (*Medicago sativa*) in various bacterial strains”. International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis, 2 (1), 65-69.

Kalaylı E., Beyatlı Y., (2003), “*Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA 'ları”. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 1 (12), 24-35.

Kalkan S., Halkman K., (2006), “*Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar”. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4 (1), 1-11.

Karunakaran E., Biggs C.A., (2011), “Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins”, Applied Microbiology and Biotechnology, 89 (4), 1161-1175.

Katı H., Karaca B., Gülşen Ş.H., (2016), “Toprakta izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması”, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 20 (2), 281-290.

Kelebek H., Canbaş A., (2010), “Hicaz narı şırasının organik asit şeker ve fenol bileşikleri içeriği ve antioksidan kapasitesi”, Gıda, 35 (6), 439-444.

Knetsch M.L., Koole, L.H., (2011), “New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles”, Polymers, 3 (1), 340-366.

Kumar D., Bhat Z.A., Singh P., Khatanglaker V., Bhujbal S.S., (2011), “Antiasthmatic and antiallergic potential of methanolic extract of leaves of *Ailanthus excelsa*”, Revista Brasileira de Farmacognosia, 21 (1), 139-145.

Kumari S., Sarkar P.K., (2016), “*Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment”, Food Control, 69, 20-29.

Kurt H., Şahin G., (2013), “Bir Ziraat Coğrafyası Çalışması: Türkiye’de Nar (*Punica granatum* L.) Tarımı”, Marmara Coğrafya Dergisi, (27), 551-574.

Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S., (2006), “Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract”, Food Chemistry, 96 (2), 254–60.

Lindsay D., Brözel V. S., Von Holy A. (2006). “Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation”, Journal of food protection, 69 (5), 1168-1172.

Lindsay D., Brözel V.S., Von Holy A., (2005), “Spore formation in *Bacillus subtilis* biofilms”, Journal of Food Protection, 68 (4), 860-865.

- Liu Y.L., Elsholz B., Enfors S.O., Gabig-Ciminska M., (2007), “Confirmative electric DNA array-based test for food poisoning *Bacillus cereus*”, *Journal of Microbiological Methods*, 70 (1), 55–64.
- Lopez D., Mielich-Süss B., (2015), “Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation”, *Environmental Microbiology*, 17 (3), 555-565.
- Lopez D., Vlamakis H., Kolter R., (2009), “Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*”. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 152-163.
- Lu J., Yuan Q., (2008), “A New Method for Ellagic Acid Production From Pomegranate Husk”, *Journal of Food Process Engineering*, 31, 443-454.
- Lye C., (2008), “Pomegranate Preliminary Assessment of the Potential for an Australian Industry”, RIRDC Publication No. 08/153 RIRDC Project No. GPI-1A, s. 18, Avustralya.
- Marley E.F. , Saini N.K., (1995), “Fatal *Bacillus cereus* Meningoencephalitis in an Adult with Acute Myelogenous Leukemia”, *Southern Medical Journal*, 88 (9), 969.
- McDonnell G., Russell, A.D., (1999), “Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance”, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1), 147-179.
- Meral R., (2016), “Farklı Isıl İşlem Uygulamalarının Fenolik Bileşenler Üzerine Etkisi-Derleme Makalesi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of The Institute of Natural and Applied Sciences*, 21 (1), 55-67.
- Mirdehghan S.H., Rahemi M., (2007), “Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit”, *Scientia Horticulturae*, 111 (2), 120–127.
- Morikawa M., (2006), “Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (1), 1-8.
- Neal-McKinney J.M., Lu X., Duong T., Larson C.L., Call D.R., Shah D.H., Konkel, M.E., (2012), “Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry”, *PLoS One*, 7 (9), e43928.
- Neill S., Gould K.S., Kilmartin P.A., Mitchell K.A., Markham K.R., (2002), “Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*”, *Plant, Cell and Environment*, 25, 539-547.
- Neill S.O., Gould K.S., (2003), “Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?”, *Functional Plant Biology*, 30, 865–873.
- Noss C.I., Dennis W.H., Olivieri V.P., (1983), “Reactivity of Chlorine Dioxide with Nucleic-acids and Proteins”, *Ann Arbor Science Publishers*.

Oğuz H.İ., Ukaz İ., Eroğlu D., (2011), “Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde Nar (*Punica Granatum* L.) Üretimi ve Pazarlanması”, GAP VI. Tarım Kongresi-Sunulu Bildiri.

Okumuş G., Yıldız E., Akpınar-Bayazit A., (2015), “Doğal Antioksidan Bileşikler: Nar Yan Ürünlerinin Antioksidan Olarak Değerlendirilmesi”, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 29 (2), 203-214.

Oliveira D.R., (1992), “Physico-chemical aspects of adhesion”, Biofilms - Science and Technology, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 45-58.

Panichayupakaranant P., Tewtrakul S., Yuenyongsawad S., (2010), “Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract”, Food Chemistry, 123 (2), 400-403.

Pena W.E.L., de Andrade N.J., Soares N.F.F., Alvarenga V.O., Rodrigues S.J., Granato D., Zuniga A.D.G., Sant’Ana A.S., (2014), “Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time”, International Dairy Journal, 34 (1), 153-158.

Piggot P.J., (2009), “*Bacillus subtilis*”. Encyclopedia of Microbiology, 3, 45-56.

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, 269-276.

Pringle J.H., Fletcher M., (1983), “Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces”, Applied and Environmental Microbiology, 45, 811–817.

Qu W., Pan Z., Ma H., (2010), “Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc”, Journal of Food Engineering, 99, 16-23.

Ramos-Villarroel A.Y., Martín-Belloso O., Soliva-Fortuny R., (2015), “Combined effects of malic acid dip and pulsed light treatments on the inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* on fresh-cut produce”, Food Control, 52, 112-118.

Raybaudi-Massilia R.M., Mosqueda-Melgar J., Soliva-Fortuny R., Martin-Belloso O., (2009), “Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials”, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8, 157–80.

Ricke S.C., (2003), “Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials”, Poultry Sciences, 82, 632-639.

Sadiq R., Rodrigue, M.J., (2004), “Disinfection by-products (DBPs) in drinking water 381 and predictive models for their occurrence: A review”, Science of Total Environment, 321, 21-46.

- Sangeetha J., Vijayalakshmi K., (2011), “Determination of Bioactive Components of Ethyl Acetate Fraction of Punica granatum Rind Extract, Research Article”, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 3 (2), 116-122.
- Santas J., Almajano M., Carbó R., (2010), “Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts”, International Journal of Food Science and Technology, 45, 403-409.
- Sar T., Stark B.C., Yesilcimen Akbas M., (2017), “Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin”, Bioengineered, 8 (2), 171-181.
- Sarıca Ş., (2011), “Nar Suyu Yan Ürünlerinin Hayvan Beslemede Kullanım Olanakları”, GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28 (2), 97-101.
- Schmidt R.H., (2012), “Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations”, University of Florida IFAS Extension.
- Shao L., Shu Z., Sun S.H., Peng C.H., Wang X., Lin Z.H., (2007), “Antioxidation of anthocyanins in photosynthesis under high temperature stress”, Journal of Integrative Plant Biology, 49, 1341–1351.
- Sharma A., Anand, S.K. (2002), “Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry-a case”, Food Control, 13, 469-477.
- Simões L.C., (2013), “Biofilms in drinking water”, In: Simões M, Mergulhão F, editors. Biofilms in bioengineering. New York (NY): Nova Science, 157-189.
- Simões M., Simões L.C., Vieira M.J., (2010), “A review of current and emergent biofilm control strategies”, LWT - Food Science and Technology, 43, 573-583.
- Singh M., Jha A., Kumar A., Hettiarachchy N., Rai A.K., Sharma D., (2014), “Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril”, Journal of Food Science and Technology, 51 (9), 2070-2077.
- Soni A., Oey I., Silcock P., Bremer P., (2016), “*Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies”, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15, 1139-1148.
- Srey O., Kabir I., Ha S., (2013), “Biofilm formation in food industries: A food safety concern”, Food Control, 31, 572-585.
- Stern J.L., Hagerman A.E., Steinberg P.D., Mason P.K., (1996), “Phlorotannin protein interactions”. Chemical Ecology, 22 (10), 1887-1899.
- Stewart P.S., Costerton J.W., (2001), “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms”, Lancet, 358, 135-138.

Stover E., Mercure E.W., (2007), “The Pomegranate: A New Look at the Fruit of Paradise”, Hort Science, 42 (5), 1088-1092.

Syed D.N., Afaq F., Mukhtar H., (2007), “Pomegranate derived products for cancer chemoprevention”, Seminars in Cancer Biology, 17, 377-385.

Şahin A., (2013), “Nar Yetiştiriciliği”, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.

Şar T., Akbaş M.Y., (2018) “*B. cereus* Biyofilmlerinin Sitrik Asit Uygulamaları İle Kontrolü”, GIDA, 43 (4): 605-616

Şenel Y., Başoğlu F., (2002), “Gıda İşletmelerinde Kullanılan Bazı Dezenfektanların Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri”, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16, 105-115.

Şimşek M., İkinci A., (2017), “Narın (*Punica granatum* L.) İnsan Sağlığına Etkileri, Derleme Makalesi/Review Article”, Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21 (4), 494-506.

Taguri T., Tanaka T., Kouno I., (2004), “Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease”, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, 1965-1969.

Temiz M.G., Özgüven A.I., (2010), “Nar (*Punica granatum*)’da Farklı Büyüme Düzenleyicilerinin ve Farklı Ekspant Kaynaklarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri”, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 22(2), 168-172.

Thwaite, J. E., Atkins, H.S. (2012) “*Bacillus-Anthrax*; food poisoning”. Medical Microbiology, 8, 237-244.

TUIK (2017a), Bitkisel Üretim İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu.

TUIK (2017b), Bitkisel Ürün Denge Tabloları, Meyveler, sert kabuklular ve içecek bitkileri, Türkiye İstatistik Kurumu.

Türkyılmaz M., (2013), “Anthocyanin and organic acid profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from registered varieties in Turkey”, International Journal of Food Science & Technology, 48 (10), 2086–2095.

Türkyılmaz M., Tağı Ş., Özkan M., (2017), “Effects of Extraction Solvents on Polyphenol Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Pomegranate Parts”, Akademik Gıda, 15 (2); 109-118.

Ulteea A., Smida E.J., (2001), “Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*”, International Journal of Food Microbiology, 64, 373-378.

Ünal, A. (2011). “Bahçe Tarımı-II., Yumuşak Çekirdekli Meyve Türleri ve Nar Yetiştiriciliği”, Anadolu Üniversitesi Yayını. 2358, 16-19, Eskişehir.

Van Haute S., Sampers I., Holvoet K., Uyttendaele M., (2013), “Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing”, *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (9), 2850-2861.

Var I., Şık A., Aslan G., (2015), “Gıda işletmelerinde biyofilm ve mücadele yöntemleri”, *Dünya Gıda (E-Dergi)*, 92-96.

Virto R., Manas P., Alvarez I., Condon S., Raso J., (2005), “Membrane damage and 399 microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5022-5028.

Viuda-Martos M., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A., (2010), “Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 635-654.

Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R., (2008), “Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community”, *Genes and Development*, 22, 945-953.

Wang C., Stanciu C., Ehrhardt C., Yadavalli V.K., (2015), “Morphological and mechanical imaging of *Bacillus cereus* spore formation at the nanoscale”, *Journal of Microscopy*, 258 (1), 49-58.

Waters B.W., Hung Y. C., (2014), “The effect of organic loads on stability of various chlorine-based sanitisers”, *International Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 867-875.

Web 1, (2009), <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/CAN-106-Determination-Punicalagins-Pomegranate-LPN2281-EN.pdf>, (Erişim Tarihi: 14/05/2018).

Wijman J.G., de Leeuw P.P., Moezelaar R., Zwietering M.H., Abee T., (2007), “Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1481-1488.

Xu Y., Shi C., Wu Q., Zheng Z., Liu P., Li G., Peng X., Xia X., (2017), “Antimicrobial Activity of Punicalagin Against *Staphylococcus aureus* and Its Effect on Biofilm Formation”, *Foodborne Pathogens and Disease*, 14 (5), 282-287.

Yaman K., (2012), “Bitkisel Atıkların Değerlendirilmesi ve Ekonomik Önemi”. *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi*, 12 (2), 339-348.

Yaman S., Öcal Ö., Toprak, Z., Avcı F., Bayazit S., Çalışkan O., (2015) “Farklı Yükseltelerde Yetiştirilen ‘Hicaznar’ Çeşidinin Meyve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi”, *Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, 2(2): 9-15.

Yıldız H., Baysal T., (2013), “Bitkisel Fenoliklerin Kullanım Olanakları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri”, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 29, 35.

Zarei M., Azizi M., Zeinolabedin B.S., (2011), "Evaluation of Physicochemical Characteristics of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit during Ripening", Fruits, 66, 121-129.

Zhu C., Liu X., (2013), "Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology", Carbohydrate Polymers, 92 (2), 1197-1202.

ÖZGEÇMİŞ

Cansel ALBAYRAK 1992 yılında İstanbul’da doğdu. 2010 yılında başladığı Uluslararası Saraybosna Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünü 2015 yılında başarıyla tamamlayarak 2017 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı.