T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

SICAKLIK, PH, SU AKTİVİTESİ, İNOKULUM YOĞUNLUĞU VE BAZI MANTAR EKSTRAKTLARININ *LİSTERİA MONOCYTOGENES* GELİŞİMİ VE BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

MUNA İDRİSS ELMASHAİ ELMAJDOUB

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

NİSAN - 2021
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Muna İdriss Elmashai ELMAJDOUB tarafından hazırlanan "**Sıcaklık, pH, su aktivitesi, inokulum yoğunluğu ve bazı mantar ekstraktlarının *Listeria monocytogenes* gelişimi ve biyofilmi üzerine etkileri**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **07.04.2021** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Kerem CANLI Dokuz Eylül Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Zafer SANCAK Kastamonu Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Prof. Dr. İzzet ŞENER .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Muna İdriss Elmashai ELMAJDOUB

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SICAKLIK, PH, SU AKTİVİTESİ, İNOKULUM YOĞUNLUĞU VE BAZI MANTAR EKSTRAKTLARININ *LİSTERİA MONOCYTOGENES* GELİŞİMİ VE BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

MUNA İDRİSS ELMASHAİ ELMAJDOUB

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN: PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

Listeria monocytogenes, gıda işleme tesislerinde hammadde, ekipman ve insan faaliyetleri yoluyla yayılıp; gıda ile temas eden yüzeylerde uzun süreler kalabilen ve bu sayede üretilen yeni gıda ürünlerinin de kontamine olmasına sebep olan bir patojendir. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda üreme yeteneği sebebiyle büyük sorunlara neden olmaktadır. Büyük riske sebep olan *L. monocytogenes*'in gelişmesini etkileyen parametrelerin ve bunların birbirleriyle ilişkilerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple, bu tez çalışmasında 3 farklı makrofungustan, 4 ayrı çözücü ile elde edilmiş toplam 12 ekstraktın *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesinin yanı sıra; inokulum miktarı, sıcaklık, pH, su aktivitesi (a_w) ve makrofungus ekstraktı varlığının hem üreme, hem de biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Ekstraktların antibakteriyel etkileri MİK ve MBK testleri ile incelenmiş ve arkasından *L. monocytogenes* biyofilmini inhibe etme potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda 12 mantar ekstraktının hepsinin farklı düzeylerde MİK değerleri ile etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak MİK testinin arkasından yapılan MBK testi, bu 12 ekstrakttan sadece ikisinin (*Phellinus hartigii* etil alkol ve kloroform) MİK konsantrasyonunun bakteriyosidal etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bunun dışında 5 ekstrakt da (*Fomitopsis pinicola* aseton, etil alkol, kloroform, etil asetat ve *P. hartigii* etil alkol) MİK konsantrasyonu için bakteriyostatik etki göstermiştir. Buna ek olarak *P. hartigii* kloroform ve aseton ekstraktlarının doza bağlı olarak değişen düzeylerde biyofilm aktivatörü olarak davrandığı görülürken, çalışılan ekstraktlardan sadece *F. pinicola* kloroform ekstraktının konsantrasyona bağlı olarak farklı seviyelerde biyofilm inhibitörü olarak etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etki eden parametreler için yapılan ikili lojistik regresyon analizi ve biyofilm üretilmesi üzerinde parametrelerin etkileri için uygulanan çok değişkenli regresyon analizi parametrelerden sadece inokulum yoğunluğunun etkisiz olduğunu, bunun dışındaki diğer parametrelerin tamamının hem üremede, hem de biyofilm oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER:*Listeria monocytogenes, Phellinus hartigii, Fomitopsis pinicola, Fomes fomentarius*, MİK, MBK, antibiofilm, inokulum miktarı, sıcaklık, pH, su aktivitesi

Nisan 2021, 134 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

EFFECTS OF TEMPERATURE, PH, WATER ACTİVİTY, İNOCULUM DENSİTY AND SOME FUNGİ EXTRACTS ON THE GROWTH AND BİOFİLM OF *LİSTERİA MONOCYTOGENES*

MUNA İDRİSS ELMASHAİ ELMAJDOUB

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
SUPERVISOR:PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

Listeria monocytogenes is spread in food processing plants through raw materials, equipment and human activities and it is a pathogen that can remain on food contact surfaces for a long time, thus causing contamination of new food products. In addition, it causes major problems due to its ability to reproduce at low temperatures. It is of great importance to know the parameters affecting the development of *L. monocytogenes*, which causes great risk, and their relationships with each other. For this reason, in this thesis study, besides determining the antibacterial and antibiofilm activities of 12 extracts obtained from 3 different macrofungi with 4 different solvents against *L. monocytogenes*; it was aimed to observe the effect of inoculum size, temperature, pH, water activity (a_w) and the presence of macrofungus extract on both growth and biofilm formation. The antibacterial effects of the extracts were examined by MIC and MBC tests, and then their potential to inhibit *L. monocytogenes* biofilm was investigated. As a result of the studies, it was found that all 12 mushroom extracts showed effects with different MIC values. However, the MBC test performed after the MIC test revealed that only two of these 12 extracts (*Phellinus hartigii* ethyl alcohol and chloroform) had a bacteriocidal effect for MIC concentration. Apart from that, 5 extracts (*Fomitopsis pinicola* acetone, ethyl alcohol, chloroform, ethyl acetate and *P. hartigii* ethyl alcohol) also showed bacteriostatic effect for MIC concentration. In addition, while *P. hartigii* chloroform and acetone extracts were observed to act as biofilm activators at varying levels depending on the dose, only *F. pinicola* chloroform extract was observed to act as inhibitors at different levels depending on the concentration. In addition, the binary logistic regression analysis for the parameters affecting the growth of *L. monocytogenes* and the multilevel regression analysis applied for the effects of the parameters on the biofilm production revealed that only the inoculum size was ineffective, and that all other parameters were effective in both growth and biofilm formation.

KEYWORDS:*Listeria monocytogenes*, *Phellinus hartigii*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, MIC, MBC, antibiofilm, inoculum size, temperature, pH, water activity

April 2021, 134 Page

TEŞEKKÜR

Bizi her zaman destekleyen ve ne kadar uzakta olursa olsunlar yanımızda olan bazı insanlar için teşekkür sözü yeterli değildir.

Öncelikle aileme, özellikle de anneme şükranlarımı sunmak istiyorum. Onlar için her zaman Allah'tan uzun ömür ve sağlık diliyorum. Ayrıca, eşime yurtdışında benimle birlikte olduğu için teşekkür ederim.

Tezimi bitirmeme yardımcı olan herkese, özellikle danışmanım Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e benim için yaptığı her şey için teşekkür ederim.

Ayrıca, tezde kullandığım mantar örneklerini kendi özel koleksiyonundan bana veren Doç. Dr. Ilgaz AKATA'ya da teşekkürlerimi sunuyorum.

Muna İdriss Elmashai ELMAJDOUB

Kastamonu, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Familya: Listeriaceae 2
1.1.1 Cins: Listeria 3
1.1.2 *Listeria monocytogenes* (Murray, Webb ve Swann) Pirie, 1940 3
1.2 *L. monocytogenes*'de Bakteriyel Büyüme 4
1.2.1 Sıcaklık 4
1.2.2 pH 4
1.2.3 Su Aktivitesi (a_w) 4
1.2.4 İnokulum Miktarı 5
1.3 Biyofilm 6
1.4 Anti-biyofilm Stratejileri 8
1.5 Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Makrofunguslar 9
1.5.1 *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat. 9
1.5.2 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst 10
1.5.3 *Fomes fomentarius* (L.) Fr. 11
1.6 Makrofungus Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler 12
1.6.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) 13
1.6.2 Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) 14
1.7 Tezin Amacı 14
2. KAYNAK TARAMASI **15**
2.1 Sıcaklığın *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi 15
2.2 pH Değerinin *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi 16
2.3 Su Aktivitesinin *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi 17
2.4 İnokulum Miktarının *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi 18
2.5 *L. monocytogenes* Biyofilmini Etkileyen Faktörler 19
2.6 Makrofungusların *L. monocytogenes* Üzerindeki Antibakteriyel Aktivitesi 21
2.7 Makrofungusların Antibiyofilm Aktiviteleri 22
3. MATERYAL VE YÖNTEM **24**
3.1 Makrofungus Örnekleri 24
3.2 Araştırmada Kullanılan Mikroorganizma 24
3.3 Materyaller 24
3.3.1 Distile Su 24
3.3.2 Kimyasallar 24

3.3.2.1 Baryum klorür ($BaCl_2$) 24
3.3.2.2 Sülfürik asit (H_2SO_4) 25
3.3.2.3 Dimetil sülfoksit (DMSO) 25
3.3.2.4 Sodyum klorür (NaCl) 26
3.3.2.5 Tampon çözeltiler 26
3.3.2.6 Kristal viyole boyası 27
3.3.3 Ekstraksiyon İşleminde Kullanılan Çözücüler 27
3.3.3.1 Aseton 28
3.3.3.2 Etil alkol 28
3.3.3.3 Etil asetat 29
3.3.3.4 Kloroform 30
3.3.4 Besiyerleri 31
3.3.4.1 Nutrient agar 31
3.3.4.2 Mueller hinton broth besiyeri 31
3.3.4.3 Nutrient broth besiyeri 32
3.3.5 Laboratuvar Gereçleri 32
3.3.5.1 Pipet ipuçları 32
3.3.5.2 Petri kapları 33
3.3.5.3 96 Kuyucuklu plakalar 34
3.3.5.4 Falcon test tüpleri 34
3.3.5.5 Steril plastik öze 35
3.3.5.6 Filtre kâğıtları 36
3.3.5.7 Buharlaştırma balonu 36
3.3.6 Cihazlar 37
3.3.6.1 Çalkalayıcı 37
3.3.6.2 Terazi 38
3.3.6.3 Mikroplaka okuyucu 38
3.3.6.4 Pipetler 39
3.3.6.5 Otoklav 40
3.3.6.6 İnkübatör 40
3.3.6.7 Döner buharlaştırıcı 41
3.3.6.8 McFarland densitometresi 42
3.3.6.9 pH metre 42
3.4 Yöntemler 43
3.4.1 Ekstraksiyon Prosedürü 43
3.4.2 *Listeria monocytogenes*'in Kültüre Edilmesi 45
3.4.3 İnokulumun Hazırlanması 45
3.4.4 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Testi 46
3.4.5 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon Testi 47
3.4.6 Biyofilm Oluşum ve Ölçme Parametrelerinin Belirlenmesi 48
3.4.7 Antibiyofilm Aktivite Testi 49
3.4.8 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etkisi 51
3.4.9 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi 59
3.5 İstatistiksel Analiz 59
4. BULGULAR 60
4.1 Ekstraksiyon Verimi 60
4.2 MİK Testi Sonuçları 62

4.3 MBK Testi Sonuçları 64
4.4 Biyofilm Oluşum ve Ölçme Parametrelerinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar 65
4.5 Antibiyofilm Aktivitesi Sonuçları 70
4.6 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etkisi İle İlgili Sonuçlar 73
4.7 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi İle İlgili Sonuçlar 73
4.8 İstatistiksel Analiz Sonuçları 73
4.8.1 MİK ve MBK Verileri İle İlgili İstatistiksel Analiz 73
4.8.2 Biyofilm Oluşum ve Ölçme Parametrelerinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar İle İlgili İstatistiksel Analiz 97
4.8.3 Antibiyofilm Aktivite Sonuçlarına Ait Sonuçlar İle İlgili İstatistiksel Analiz 97
4.8.4 *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etki Eden Parametreler İle İlgili İstatistiksel Analiz 97
4.8.5 *L. monocytogenes*'in Biyofilm Üretmesi Üzerine Etki Eden Parametreler İle İlgili İstatistiksel Analiz 98
5. TARTIŞMA 103
5.1 Ekstraksiyon verimi 103
5.2 MİK ve MBK Testleri 103
5.3 Makrofungusların Antibiyofilm Aktiviteleri 107
5.4 *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etki Eden Parametreler 107
5.5 *L. monocytogenes*'in Biyofilm Üretmesi Üzerine Etki Eden Parametreler 113
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 115
KAYNAKLAR 116
EKLER 130
EK A - İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI 131
ÖZGEÇMİŞ 134

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Biyofilm gelişme aşamalarının şematik gösterimi 7
Şekil 1.2 *Phellinus hartigii* 10
Şekil 1.3 *Fomitopsis pinicola* 11
Şekil 1.4 *Fomes fomentarius* 12
Şekil 1.5 MİK Testi 14
Şekil 3.1 Baryum klorür 25
Şekil 3.2 Dimetil sülfoksit 26
Şekil 3.3 Standart tampon çözeltiler 27
Şekil 3.4 Kristal viyole boyası 27
Şekil 3.5 Aseton 28
Şekil 3.6 Yüzey dezenfeksiyonu için kullanılan etil alkol 29
Şekil 3.7 Etil asetat 30
Şekil 3.8 Kloroform 30
Şekil 3.9 Nutrient agar besiyeri 31
Şekil 3.10 Mueller hinton broth besiyeri 32
Şekil 3.11 Pipet uçları (sarı ve mavi) 33
Şekil 3.12 Petri kapları 33
Şekil 3.13 96 kuyucuklu mikroplaka (U-tabanlı) 34
Şekil 3.14 Falcon test tüpleri 35
Şekil 3.15 Steril plastik öze 35
Şekil 3.16 Filtre kâğıdı 36
Şekil 3.17 Buharlaştırma balonu 37
Şekil 3.18 Çalkalayıcı 37
Şekil 3.19 Terazi 38
Şekil 3.20 Mikroplaka okuyucu 39
Şekil 3.21 Pipetler 39
Şekil 3.22 Otoklav 40
Şekil 3.23 İnkübatör 41
Şekil 3.24 Döner buharlaştırıcı 41
Şekil 3.25 McFarland densitometresi 42
Şekil 3.26 pH metre 43
Şekil 3.27 Öğütülmüş makrofungus örnekleri 43
Şekil 3.28 Çalkalama ile ekstraksiyon 44
Şekil 3.29 Filtre kâğıdı ile filtreleme işlemi 44
Şekil 3.30 Döner buharlaştırıcıyla çözücünün uzaklaştırılması 45
Şekil 3.31 İnokulum hazırlanması 46
Şekil 3.32 MİK testi 47
Şekil 3.33 İnkübasyon 47
Şekil 3.34 MBK testi 48
Şekil 3.35 Biyofilm testi 49
Şekil 3.36 Farklı pH ve aw değerlerine sahip besiyerleri 52
Şekil 4.1 Ekstraksiyon verimi (%) 61
Şekil 4.2 MİK testi sonuçları (µg/mL) 63
Şekil 4.3 Tabanı düz mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar 65

Şekil 4.4 U-tabanı mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar 67
Şekil 4.5 Tabanı düz mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar 67
Şekil 4.6 U-tabanı mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar 68
Şekil 4.7 Biyofilm oluşum ve ölçme parametrelerinin belirlenmesine ait birleştirilmiş sonuçlar 69
Şekil 4.8 *P. hartigii* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesi..... 70
Şekil 4.9 *P. hartigii* aseton ekstraktının antibiyofilm aktivitesi..... 72
Şekil 4.10 *F. pinicola* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesi 72
Şekil 4.11 İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği..... 98
Şekil 4.12 pH ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği..... 99
Şekil 4.13 a_w ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği 100
Şekil 4.14 Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği 101

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 *L. monocytogenes*'in biyofilm gelişiminin değerlendirilmesinde kullanılan faktörler 51
Tablo 3.2 Faktöryel tasarım 53
Tablo 3.3 Faktöryel tasarım 54
Tablo 3.4 Faktöryel tasarım 55
Tablo 3.5 Faktöryel tasarım 56
Tablo 3.6 Faktöryel tasarım 57
Tablo 3.7 Faktöryel tasarım 58
Tablo 3.8 Faktöryel tasarım 59
Tablo 4.1 5 mL DMSO içinde çözülmüş gram cinsinden ekstrakt miktarları 60
Tablo 4.2 Ekstraksiyon verimi (%) 60
Tablo 4.3 Ekstrakt stok konsantrasyonları (mg/mL) 62
Tablo 4.4 MİK testi sonuçları (µg/mL) 63
Tablo 4.5 MBK testi sonuçları (µg/mL) 64
Tablo 4.6 Biyofilm oluşum ve ölçme parametrelerinin belirlenmesine ait sonuçlar 66
Tablo 4.7 Üç ekstraktın farklı konsantrasyonlarına ait biyofilm absorbanslarının ortalamaları ve standart sapmaları 71
Tablo 4.8 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 74
Tablo 4.9 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 75
Tablo 4.10 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 76
Tablo 4.11 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 77
Tablo 4.12 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 78
Tablo 4.13 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 79
Tablo 4.14 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 80
Tablo 4.15 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 81
Tablo 4.16 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 82
Tablo 4.17 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 83
Tablo 4.18 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 84
Tablo 4.19 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 85
Tablo 4.20 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar 86

Tablo 4.21 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar..... 87
Tablo 4.22 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar..... 88
Tablo 4.23 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar..... 89
Tablo 4.24 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar..... 90
Tablo 4.25 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar..... 91
Tablo 4.26 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar..... 92
Tablo 4.27 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar..... 93
Tablo 4.28 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar..... 94
Tablo 4.29 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar..... 95
Tablo 4.30 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar..... 96
Tablo 4.31 İkili (binary) lojistik regresyon analiz testi sonuçları..... 98
Tablo 4.32 İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları..... 99
Tablo 4.33 pH ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları..... 100
Tablo 4.34 a_w ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları..... 100
Tablo 4.35 Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları..... 101
Tablo 4.36 Çoklu lineer regresyon analiz testi sonuçları..... 102
Tablo 5.1 MBK/MİK oranları..... 104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µL : Mikrolitre
mL : Mililitre
nm : Nanometre

Kısaltmalar

AB : Avrupa Birliği
a_w : Su Aktivitesi
dH_2O : Distile Su
DMSO : Dimetil Sülfoksit
EtOAc : Etil Asetat
EtOH : Etil Alkol
HCl : Hidroklorik Asit
HPM : Hücre Dışı Polimerik Madde
MBK : Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MHB : Mueller Hinton Broth
MİK : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NB : Nutrient Broth
NaCl : Sodyum Klorür
NaOH : Sodyum Hidroksit
QA : Quorum Algılama
PTFE : Politetrafloroetilen
sdH_2O : Steril Distile Su
TSB : Tryptic Soy Broth

1. GİRİŞ

Günümüzde küreselleşmeye bağlı olarak artan uluslararası seyahat ve gıda ticareti, beraberinde gıda kaynaklı bulaşıcı hastalıkların yayılma riskinde ciddi bir artışı da getirmiştir (Käferstein vd., 1997). Avrupa Birliği (AB) sağlık birimleri tarafından takip altında tutulan bir patojen olan *Listeria monocytogenes*'in neden olduğu listeriyoz, AB'deki bulaşıcı hastalıklar arasında en yüksek hastaneye yatış oranına (%91,6) neden olan enfeksiyondur. Ayrıca, %17,8'lik tahmini ölüm oranıyla, AB'de üçüncü sıradaki ölüm nedenidir (EFSA - ECDPC, 2014; Lamon vd., 2015). İnsanlarda görülen listeriyoz vakalarının büyük çoğunluğunun gıda kaynaklı olduğu varsayılmaktadır (Swaminathan ve Gerner-Smidt, 2007; Lüth vd., 2019).

L. monocytogenes Listeriaceae ailesi içinde sınıflandırılan ve İngiliz cerrah Joseph Lister'e ithafen adlandırılmış bir gram pozitif bakteridir (Batt, 2014). *L. monocytogenes* bir mikroorganizmanın gelişmesi için -0,4°C gibi oldukça düşük olan bir sıcaklıkta üremeye devam edebilir, hatta -18°C gibi mikroorganizmaların tamamen donmasına, bu sebeple yaşamın durmasına neden olan sıcaklıklardan bile sağ çıkmayı başarabilmektedir. Bu sebeple, normalde birçok mikroorganizma için üremeye karşılık bir önlem olarak soğutma kullanılırken, *L. monocytogenes* bu şartlarda çoğalmaya devam ederek gıdalarda ciddi problemlere yol açmaktadır (Walker vd., 1990; Nowak vd., 2015; Santos vd., 2019). *L. monocytogenes* oksijen bulunan veya bulunmayan ortamlarda hayatta kalabilen fakültatif anaerobik bir bakteridir (Tabrizi ve Marsal, 2019). *L. monocytogenes* 5-6 kamçı (flagella) üretir. 30°C ve altında kamçılarını kullanarak hareket eder ve yapılan *in vitro* çalışmalarda hareket genlerinin 37°C'de aşağı regüle edildiği kanıtlanmıştır. Ancak bu durumun suştan suşa değişiklik gösterdiği de gösterilmiştir (Peel vd., 1988; Gründling vd., 2004; Way vd., 2004; O'Neil ve Marquis, 2006). *L. monocytogenes*'in konakçının istilasını hızlandırmak amacıyla hareket edebilmek için kamçılarını kullanıldığı ve kamçı aracılığıyla sağlanan hareketin bakterinin konakçıya girmesinden hemen sonra *L. monocytogenes* enfeksiyonunu arttırdığı bilinmektedir (O'Neil ve Marquis, 2006).

İnsan nüfusunun yaklaşık %0,5 ila 5'inin gastrointestinal kanalının kısa süreli ve asemptomatik olarak düşük seviyelerde *L. monocytogenes* taşıdığı bilinmektedir (Bojsen-Moller, 1964; Kampelmacher ve van Noorle Jansen, 1969; MacGowan vd., 1994; Cobb vd., 1996; Grif vd., 2003; Becattini vd., 2017). Anneden vajinal yolla bulaşan bu patojen yeni doğan bebeklerde menenjite neden olduğundan, hamile annelere genellikle *L. monocytogenes* ile kontamine olabilen ve bu bakterilerin çok hızlı bir şekilde çoğalmasına izin veren krem peynir, camambert peyniri, beyaz peynir ve taze beyaz peynir gibi yumuşak peynirleri yememeleri tavsiye edilmektedir (Genigeorgis vd., 1991).

Bu patojen, gıda işleme tesislerinde hammadde, ekipman ve insan faaliyetleri yoluyla yayılabilmekte ve birçok gıda ile temas eden yüzeye yapışabilmektedir. Bütün bunlara bir de gıda işleme tesislerinde hijyen önlemlerinin yetersiz oluşu eklendiğinde, *L. monocytogenes* bu ortamlarda uzun süreler kalabilmekte ve üretilen yeni gıda ürünlerinin de kontamine olmasına sebep olmaktadır (Carpentier ve Cerf, 2011). Ayrıca, daha önce de bahsedildiği gibi düşük sıcaklıklarda üreme yeteneği sebebiyle buzdolabında muhafaza edilen hazır gıdalardaki yüksek *L. monocytogenes* prevalansı, bu gıdaların genellikle ek işlemden geçirilmeden tüketilmeleri sebebiyle büyük endişeye neden olmaktadır (Zilelidou vd., 2016).

Bu sebeple, insanlık açısından bu kadar yüksek bir riske sebep olan *L. monocytogenes*'in gelişmesini etkileyebilecek parametrelerin *L. monocytogenes*'in gelişmesi üzerine potansiyel etkisinin yanı sıra, bunların birbirleriyle ilişkilerinin de bilinmesinin büyük önem taşıdığı açıktır.

1.1 Familya: Listeriaceae

Listeriaceae familyası, tüm *Listeria* ve *Brochothrix* cinslerini kapsamaktadır. Hücreler, filamentler oluşturabilir. Gram boya ile boyandıklarında mikroskop altında Gram-pozitif olarak görünmektedir. Yine mikroskop altında kısa çubuklar şeklinde görünmektedir. Bu bakteriler, endospor üretmez, büyümesini aerobik ve fakültatif anaerobik olarak gerçekleştirir; laktat ve diğer ürünlere glikoz fermente ederler (McLauchlin vd., 2014).

1.1.1 Cins: Listeria

Listeria Pirie 1940 cinsine, daha önce de bahsedildiği gibi İngiliz cerrah ve antisepsisin öncüsü Lord Lister'in adı verilmiştir. Listeria cinsinin on türü vardır. Bunlar, *L. monocytogenes*, *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* ve *L. welshimeri*'dir (Wilkinson ve Jones, 1977; Collins vd., 1979, 1991; Talon vd., 1988; McLauchlin vd., 2014).

1.1.2 *Listeria monocytogenes* (Murray, Webb ve Swann) Pirie, 1940

Murray ve meslektaşları tarafından *L. monocytogenes*'in ilk kez izole edilmesinden sonra (Murray vd., 1926), bu bakteri *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Öte yandan, başlangıçta *Listerella hepatolytica* olarak adlandırılmış olan bu bakterinin adı, Pirie tarafından daha sonra *Listerella monocytogenes* olarak değiştirilmiştir (Pirie, 1927, 1940a). Ancak, *Listerella* cins adı daha önceden başka bir cins için kullanıldığı için, cins adı *Listeria* (Pirie, 1940b) olarak yeniden adlandırılmıştır.

Agar içeren besiyerinde büyüyen tüm *Listeria* türlerinin kolonileri ciddi görsel farklılıklar göstermemektedir. İnkübasyonun başlatılmasından 24 - 48 saat sonra, oluşan koloniler; yaklaşık 0,5 - 1,5 mm çapında, yuvarlak, yarı saydam, pürüzsüz hafif dışbükey yüzeyli, kenar hatları belirli, yarı saydam kristal yapılı bir merkeze ve pigmentsiz bir görünüme sahiptir. Bir öze ile agar yüzeyinden alındığında kolonilerin yapışkan bir yapıda olduğu görülebilir, ancak serum fizyolojikte kolay bir şekilde emülsifiye etmek mümkündür. Öte yandan agar yüzeyinden alınmış olsa bile kolonin olduğu yerde hafif bir iz kalabilir. 3 ila 7 gün arasındaki inkübe edildiğinde koloninin boyutları artar ve yaklaşık 3 ila 5 mm çapında olur. Aynı zamanda koloniler daha opak bir görünüme sahip olur ve bazen kolonilerin merkezleri çökük durumdadır. %0,25 (w/v) agar, %8 (w/v) jelatin ve %1,0 (w/v) glikozdan oluşan yarı katı besiyerinde, 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasına çizgi boyunca üredikten sonra, ortamda düzensiz ve bulanık uzantılar oluşturur. Büyüme tüm besiyeri boyunca yavaşça yayılır ve yüzeyin 3-5 mm altında şemsiyeye benzer bir maksimal büyüme bölgesi meydana gelir (Wuenscher vd., 1993). Tüm *Listeria* türleri üreme sırasında bütirik asit üretirler.

Buna bağlı olarak karakteristik tatlı karamel veya tereyağımsı bir koku açığa çıkar (Dell'Era vd., 2009).

1.2 *L. monocytogenes*'de Bakteriyel Büyüme

Çeşitli faktörler *L. monocytogenes*'in büyümesini ve hayatta kalmasını etkiler. Gıdalarda; sıcaklık, pH, su aktivitesi (a_w), tuz ve koruyucuların varlığı bu parametrelerden bazılarıdır (Kureljusic vd., 2019).

1.2.1 Sıcaklık

L. monocytogenes'in -1,5 ila 45°C arasındaki sıcaklıklarda büyüyebildiği gösterilmiştir. Ancak, bu bakteri için optimum üreme sıcaklığı 30 - 37°C arasıdır. Düşük sıcaklıklara oldukça toleranslı olan *L. monocytogenes* için, yüksek sıcaklıklar için aynı şeyi söylemek mümkün değildir. 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklar *L. monocytogenes* için öldürücüdür. Daha önce de belirtildiği gibi *L. monocytogenes* 0°C gibi düşük sıcaklıklarda üreyebildiğinden, gıdaların soğutularak depolanması sırasında yavaş da olsa büyüme potansiyeline sahiptir (Lado ve Yousef, 2007; Kureljusic vd., 2019).

1.2.2 pH

L. monocytogenes pH toleransı açısından incelendiğinde; 4,0 - 9,6 gibi geniş bir pH aralığında büyüyebildiği görülebilir. Her ne kadar yapılmış olan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in pH<4,0 olan ortamlarda büyüdüğü belirtilmemiş olsa da, asidik koşullara da nispeten tolerans gösterdiğini ortaya koyan kanıtlar mevcuttur. Ancak unutulmaması gereken, *L. monocytogenes*'in pH toleransının sıcaklığa bağlı olarak değişebileceğidir. Yüksek sıcaklıklarda *L. monocytogenes*'in asidik koşullara daha duyarlı hale geldiği bilinmektedir (Kureljusic vd., 2019).

1.2.3 Su Aktivitesi (a_w)

Su aktivitesi, ortamdaki serbest suyu göstermektedir. Bir çözeltideki serbest suyun varlığını etkileyen faktörlerden biri, çözeltideki tuz miktarıdır. *L. monocytogenes*'in

belli bir seviyeye kadar tuz miktarına karşı toleranslı olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in %13 - 14 sodyum klorür bulunan besiyerlerinde gelişebildiği belirtilmiştir (Farber vd., 1992; Kureljusic vd., 2019). Tuz varlığında hayatta kalma durumu saklama sıcaklığından etkilenmektedir. Literatürde bulunan çalışmalar, *L. monocytogenes*'in artan tuz miktarlarında hayatta kalabilme oranının, sıcaklığın düşmesiyle arttığını ortaya koymaktadır (Lado ve Yousef, 2007; Kureljusic vd., 2019).

1.2.4 İnokulum Miktarı

Bilindiği üzere, mikroorganizmaların büyüme döngüsünün lag fazı, mikroorganizmanın bölünmeye başlamadan önce yeni bir ortama adapte olması için gereken süreyi göstermektedir. Gıdalarda gelişen bazı bakterilerin davranışını modelleyen çeşitli çalışmalar, lag fazının tahmin edilmesinin, spesifik büyüme oranının tahmininden daha zor olduğunu göstermiştir (McMeekin vd., 1993; Duh ve Schaffner, 1993; Duffy vd., 1994a; Knøchel ve Gould, 1995; Robinson vd., 1998; Delignette-Muller, 1998; Augustin ve Carlier, 2000). Bu durum, lag fazını etkileyen değişkenlerin bazılarının, özellikle inokulumun fizyolojik durumu ve inokulum miktarının dikkate alınmadığını göstermektedir (Robinson vd., 2001).

Baranyi (1998) tarafından yapılmış olan çalışmanın yanı sıra, Baranyi ve Pin (1999) de inokulumdaki hücre sayısı azaldıkça, popülasyon lag fazının, bireysel lag sürelerinin dağılımına ve maksimum spesifik büyüme oranına bağlı olarak bir miktar arttığını göstermiştir. Matematiksel analizlere göre, optimum büyüme koşulları altında, bu istatistiksel etkinin yalnızca yaklaşık 10^2 - 10^3 hücrenin altındaki inokulum seviyelerinde bekleneceği tahmin edilmektedir. McKellar ve Knight (2000) ayrıca *L. monocytogenes*'in lag fazına ilişkin tek tek hücrelerin değişkenliğini hesaba katan bir model sunmuştur.

İnokulum miktarının lag fazı üzerindeki etkisine ilişkin nispeten az deneysel çalışmalar yapılmış olmasına rağmen; mevcut veriler, bunun etkisinin optimum büyüme koşulları altında besiyeri kültürlerinde (Jason, 1983) ve ayrıca gıdada (Mackey ve Kerridge, 1988, Lanciotti vd., 1992, Duffy vd., 1994b) düşük olduğunu

göstermektedir. Ancak daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, inokulum miktarı az olduğunda, stresli hücrelerde *L. monocytogenes*'in lag süresinin uzadığı gösterilmiştir (Gay vd., 1996, Augustin vd., 2000).

1.3 Biyofilm

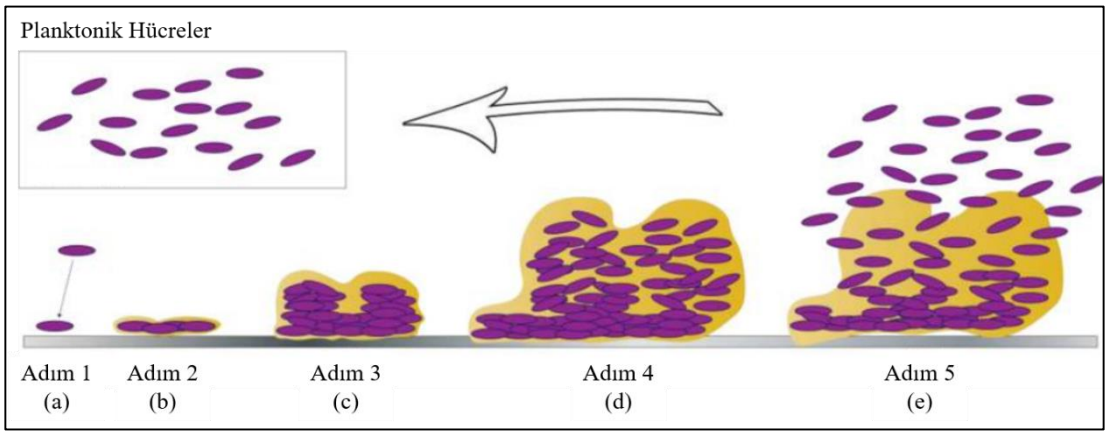
L. monocytogenes, paslanmaz çelik, polistiren ve cam dahil çeşitli yüzeylere bağlanabilmekte ve biyofilm oluşturabilmektedir (Mafu vd., 1991; Blackman ve Frank, 1996; Di Bonaventura vd., 2008). Biyofilmlerdeki mikrobiyal hücreler, hücre dışı polimerik maddeler (HPM'ler) olarak bilinen farklı biyopolimer türlerinin bir araya gelmesiyle oluşan bir hücre dışı madde matrisine gömülüdür (Donlan ve Costerton, 2002). HPM, üç boyutlu biyofilm yapısı için bir iskele oluşturur. Bu iskele, yüzeylere yapışma (adezyon) ve biyofilmdeki kohezyondan sorumludur (Flemming ve Wingender, 2010). Biyofilmin kohezyon, yük, konsantrasyon ve moleküllerin yapısı gibi çeşitli özellikleri, HPM'lerin her bir bileşenin üretimine, miktarına ve özelliklerine bağlı olarak değişebilir (Sutherland, 2001).

Biyofilm matrisi, bir biyofilmin kuru kütlesinin %90'ından fazlasını oluşturabilir (Flemming ve Wingender, 2010). Polisakkaritler, proteinler ve DNA, birçok biyofilmin hücre dışı (ekstraselüler) matrisini oluşturur (Flemming ve Wingender, 2010). Bu moleküller yüzeye yapışma, biyofilm içindeki kohezyon ve bakteri hücrelerinin toplanmasında rol oynarlar. Ayrıca, su tutma (kurumanın önlenmesi), koruyucu bariyer görevi görerek antimikrobiyal ajanlara karşı koruma, enerji deposu görevi gören organik ve inorganik bileşiklerin emilmesi ve enzimatik aktivite HPM'lerin bakteriyel biyofilmlerde gerçekleştirdiği faaliyetlerden bazılarıdır (Flemming ve Wingender, 2010).

L. monocytogenes'in değişmiş bir fenotip ve gen ekspresyonu ile karakterize, kendi kendine üretilen bir hücre dışı polimerik madde (HPM) matrisine gömülü bakteri hücrelerinin yapılandırılmış toplulukları olan biyofilmleri oluşturduğu iyi bilinmektedir (Donlan, 2002; Colagiorgi vd., 2017).

Bir biyofilm içindeki mikrobiyal hücreler karmaşık yapılar halinde organize olmaktadır. Bu hücreler, yüzeylere yapışmadan ve biyofilmdeki kohezyondan sorumlu

olan ve HPM matrisindeki karmaşık yapılara gömülürler (Flemming vd., 2007). HPM'ler ayrıca, biyofilme yapı karmaşıklığı, mikroorganizmaların öldürülmesine karşı daha yüksek direnç ve antimikrobiyallere karşı daha iyi direnç gibi çeşitli özellikler kazandırmaktadır. Dahası, biyofilm gelişiminin son aşamasında, mikrobiyal hücreler, biyofilmden ayrılabilir, planktonik formlarında çevreye dağılabilir ve potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olabilirler (Reis-Teixeira vd., 2017; Colagiorgi vd., 2017) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1 Biyofilm gelişme aşamalarının şematik gösterimi

Şekil 1.1'de (Colagiorgi vd., 2017) adımlar şu şekilde açıklanabilir:

a) İlk adımda, planktonik hücrelerin yüzeylere tersinir bağlanması gerçekleşir;
b) Yapışan hücreler tek tabaka oluşturmaya ve hücre dışı matrisi üretmeye başlar;
c) Kendi kendine üretilen ekstrapolimerik matris içindeki hücreler büyümeye ve çok katmanlı mikro koloniler oluşturmaya devam eder;
d) Hücreler tersinmez şekilde yüzeye tutturulur ve matrise gömülür: biyofilm olgunlaşır;
e) Biyofilm oluşumunun son aşamasında, hücreler biyofilmden ayrılabilir ve yeni yüzeyleri kolonileştirmeye hazır şekilde planktonik formda geri dönebilir (Vesudevan, 2014)'dan uyarlanmıştır.

L. monocytogenes gıda sektöründe kullanılan çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturabilir. Bu sebeple, bu bakteri uzun süreler boyunca ortamda bulunarak kontaminasyon kaynağı olabileceğinden, gıda güvenliği için ciddi bir tehlike oluşturmaktadır (Colagiorgi vd., 2017).

1.4 Anti-biyofilm Stratejileri

Biyofilm oluşumunun eşlik ettiği enfeksiyonların tedavisi zordur. Bunun sebeplerinden biri de biyofilmler içinde gömülen mikroorganizmalar, kendilerine ulaşan antibiyotik konsantrasyonunun düşüklüğü sebebiyle, antimikrobiyal direnç geliştirebildiği için, biyofilm oluşumunun eşlik ettiği enfeksiyonların tedavisi daha da zorlaşmaktadır. Biyofilmler, hücrelerin planktonik formlarına kıyasla antimikrobiyal ajanlara çok daha dirençlidir (Flemming vd., 2016). Biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlarla tedavisinde çoğu zaman biyofilmlere gömülmüş mikroorganizmaların tamamı ölmeyebilir. Bu nedenle, tedaviden etkilenmeyen bakteriler kimyasal maddelerin geri çekilmesinin ardından enfeksiyonun tekrarlanmasına neden olabilmektedir (Gambino ve Cappitelli, 2016; Kamaruzzaman vd., 2017). Biyofilmlerdeki bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı artan direncini açıklamak üzere çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Çeşitli stratejiler mevcuttur; ancak, bunların etkileri sınırlıdır (Ong vd., 2018).

Biyofilm enfeksiyonlarının geleneksel tedavisinde enfekte materyaller çıkarılır, ancak eklem protezleri veya biyofilm barındıran konak dokusu gibi bazı implantlar için bu enfekte materyallerin çıkarılması her zaman uygulanamayabilir (Wu vd., 2015; Ong vd., 2018).

Şu anda araştırılmakta olan anti-biyofilm stratejilerinin çoğu:

- Yüzeye bakteri yapışmasının ve bakteri kolonizasyonun engellenmesi (Liu vd., 2013; Harding ve Reynolds, 2014; Palumbo vd., 2015; Asker vd., 2016),
- Biyofilm gelişimini modüle eden sinyal moleküllerine müdahale edilmesi (Kalia, 2013; Wu vd., 2015; Hazan vd., 2016) ve
- Biyofilm matrisinin ayrıştırılması (disagregasyon) yaklaşımlarından oluşmaktadır (Flemming vd., 2016; Klare vd., 2016; Ong vd., 2018).

İlk anti-biyofilm stratejisinin hedefi, bakteriyel biyofilm gelişiminin yapışma aşamasıdır. Yapışma önleyici yüzeyler oluşturmak için yüzeylerin fizyokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi ve/veya bakteri kolonizasyonunu önlemek için yüzeylerde antimikrobiyal ajanların kullanılmasından oluşur. Mikrobiyal yüzeyler doğası gereği

hidrofobik olduğundan, yüzeyin hidrofilik polimerlerle kaplamasıyla bakteriyel yapışma önlenebilir (Harding ve Reynolds, 2014; Ong vd., 2018). Hidrofilik kaplamalar, yüzey koşullandırmasının engellenmesi ve bakteriler ile yüzeyler arasındaki elverişli etkileşimin önlemesi için yüzeylerin fizyokimyasal özelliklerini değiştirerek bakteriyel yapışmayı azaltılır (Liu vd., 2013; Harding ve Reynolds, 2014; Ong vd., 2018).

İkinci anti-biyofilm stratejisinin hedefi ise minimal algılamadır (quorum algılama, quorum sensing). Quorum algılama (QA) ise bakteri hücresinin, belirli genlerin ekspresyonu yoluyla hücre yoğunluğu ile ilgili ihtiyaçlara cevap vermesini sağlayan düzenleyici bir mekanizmadır. QA ile etkileşime girebilecek moleküllerin kullanımı, yüzeylerde bakteri adaptasyonuna karşı koymak ve biyofilm gelişimini önlemek için umut verici bir stratejidir (Wu vd., 2015; Hazan vd., 2016; Ong vd., 2018).

Üçüncü anti-biyofilm stratejisinin hedefi ise HPM matrisidir. Bu stratejide, biyofilmlerin fiziksel bütünlüğünü bozabilecek maddeler kullanılır. Kullanılan bu maddeler sayesinde mikroorganizmaları koruyan biyofilmin bütünlüğü bozulur, biyofilm matrisi dağılmaya başlar. Bu durum, sabit mikrobiyal hücrelerin antimikrobiyal ajanlara maruz kalmasına neden olabilir (Klare vd., 2016; Ong vd., 2018).

1.5 Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Makrofunguslar

Bu tez çalışmasında, *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat., *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst ve *Fomes fomentarius* (L.) Fr. olmak üzere üç makrofungus ekstraktı kullanılmıştır.

1.5.1 *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat.

Phellinus, *Hymenochaetaceae* familyasına ait 41 cins polipordan biridir. Index Fungorum'a göre *Phellinus*'un dünya çapında 138 türü vardır (Kirk, 2016). Diğer poliporların çoğu gibi *Phellinus* mantarları da saprotrofik beslenmeyle yaşamaktadır. Bu cinse ait *P. igniarius, P. linteus, P. gilvus, P. pini* ve *P. hartigii* (Şekil 1.2) (Zíbarová, 2006) gibi mantarların, hastalıkların tedavisi konusunda çeşitli

kullanımlarının olduğu bilinmekte ve genellikle geleneksel Asya tıbbında kullanılmaktadır (Zapora vd., 2016).



Şekil 1.2 *Phellinus hartigii*

1.5.2 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst

Fomitopsis pinicola (Sw. Karst), Avrupa ve Asya genelinde ılıman bölgelerdeki iğne yapraklı ormanlarda bulunan yaygın bir odunsu mantardır (Haight vd., 2019). *F. pinicola* yaygın olarak kahverengi çürük mantar olarak bilinmektedir ve hücre dışı oksidaz bulundurmaması, fenol oksidaz ve tirozinaz varlığı ile teşhis edilir (Yokoyama vd., 1975).

Fruktifikasyon organı yelpaze şeklindedir; sert, odunsu bir dokuya sahiptir ve çapı 40 cm'ye kadar büyüyebilir (Şekil 1.3) (Bishop, 2020).

Gövde parlak bir görünüme sahiptir ve türün yaşına bağlı olarak kırmızı-kahverengi veya daha açık renkte olabilir. Her yıl yeni bir katman eklenerek büyür. Mantar saprobiyonktir ve aynı zamanda parazit olabilir, canlı ağaçlarda öz çürümesine ve ölü ağaçlarda kahverengi çürümeye neden olabilir (Yokoyama vd., 1975; Bishop, 2020). *F. pinicola* gibi çürükçül mantarlarının genellikle simbiyotik olduğu düşünülür, çünkü göknar ağaçlarının aynı bölgelerinde mantar ve azot bağlayıcı bakterilerin varlığı olabilir (Balandreau, 1986; Bishop, 2020). Ayrıca, kahverengi çürük kalıntıları

parçalanmadan önce uzun süre toprakta kalabilmesine rağmen, ölü ağaç gövdelerinin çürümesiyle orman besinlerinin dolaşımına yardımcı olurlar (Gilbertson, 1981; Binder vd., 2013; Bishop, 2020). Ancak, *F. pinicola* ve diğer kahverengi çürük türleri, özellikle dalların kaldırılmasıyla meydana gelebilecek kabuk hasarının görüldüğü yerlerde anlamlı derecede orman kaybına yol açabilmektedir (Bishop, 2020).



Şekil 1.3 *Fomitopsis pinicola*

1.5.3 *Fomes fomentarius* (L.) Fr.

Yaygın olarak kav mantarı olarak da bilinen *Fomes fomentarius*, (Şekil 1.4.) (Bal ve Akgül, 2018) çok yıllık bir nekrotrofik parazit türüdür. Kuzey yarımkürede, Avrupa, Kuzey Amerika, Çin ve Japonya'da görülür. Avrupa'da kayın, huş, meşe, ıhlamur, kavak, söğüt, akçaağaç gibi çeşitli konakçı ağaçlarda ve nadiren kızılağaç ve gürgen türlerinde (Breitenbach ve Kränzlin, 1986; Ryvarden ve Gilbertson, 1993; Pál-Fám, 2006; Yamashita vd., 2010) ve bazen koniferlerde (Jahn, 1990) gelişir. Fruktifikasyon organı at toynağı gibi görünür ve çeşitli boyutlarda bulunabilir. Rengi coğrafi konuma bağlı olarak gümüşi beyaz ve griden, neredeyse siyaha kadar değişir; düşük rakımlarda ve enlemlerde daha açık renklidir (Schwarze vd., 2013). Kav mantarı erken kolonileşebilen bir türdür (Heilmann-Clausen ve Boddy, 2005). Zayıf veya sağlıklı ağaçların gövdesine kabuktan hif ile nüfuz ederek konakçı bitkide beyaz bir çürümeye neden olur. Konakçı ağacın ölümünden sonra, mantar bir ayrıştırıcı görevi görür (Schwarze vd., 2013).

Yenmeyen bu mantar türünün, 5000 yaşındaki Neolitik çağ insanı Ötzi tarafından bir kav malzemesi olarak kullanıldığı düşünülmektedir (Peintner vd. 1998; Pöder ve

Peintner, 1999). Hemostatik etkisi açısından alternatif tıpta kullanıldığı bilinmektedir (Mellin, 1786; Göpfert, 1982; Saar, 1991; Rutalek, 2002; Evans ve Kibby, 2005; Kreisel, 2014; Heklau ve Dörfelt, 2015), ayrıca yakın zamanda gerçekleştirilen farmakolojik çalışmalar bazı tümör ve lösemilere karşı anti-tümör etkisi olduğu gösterilmiştir (Park vd., 2004; Ericsson ve Ivonne, 2009; Huang vd., 2012). Mantar sterolü linoleat, protokateşaldehit, sitosterol, ergostenol, betulin ve serevisterol gibi anti-trombin, sitotoksik, anti-tümör, anti-lösemi ve antioksidan etkileri olan bazı sekonder metabolitler bu mantardan izole edilmiştir (Rösecke ve König, 2000; Feng ve Yang, 2010; Huang vd., 2012; Zang vd., 2013).



Şekil 1.4 *Fomes fomentarius*

1.6 Makrofungus Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Sadece makrofungus ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini belirlenmesinde değil, aynı zamanda yüksek bitkiler, briyofitler, likenler, eğrelti otları, algler vb. doğal kökenli diğer ekstraktlar için de kullanılabilecek birkaç yöntem vardır. Ancak en yaygın yöntemler, minimum inhibisyon konsantrasyonu ve minimum bakterisidal konsantrasyon testleridir.

1.6.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), 24 saat boyunca inkübasyon sonrasında mikroorganizmanın gözle görünür büyümesini inhibe edecek en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu olarak tanımlanır (Andrews, 2001; Sun vd., 2016).

MİK değerleri, mikrobiyal teşhis laboratuvarları tarafından esas olarak antimikrobiyal direncini doğrulamak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak çoğu zaman yeni antimikrobiyallerin *in vitro* aktivitesinin belirlenmesi için bir araştırma aracı olarak da kullanılırlar ve bu tür çalışmalardan elde edilen veriler, MİK sınır değerlerini belirlenmesini sağlar (Andrews, 2001).

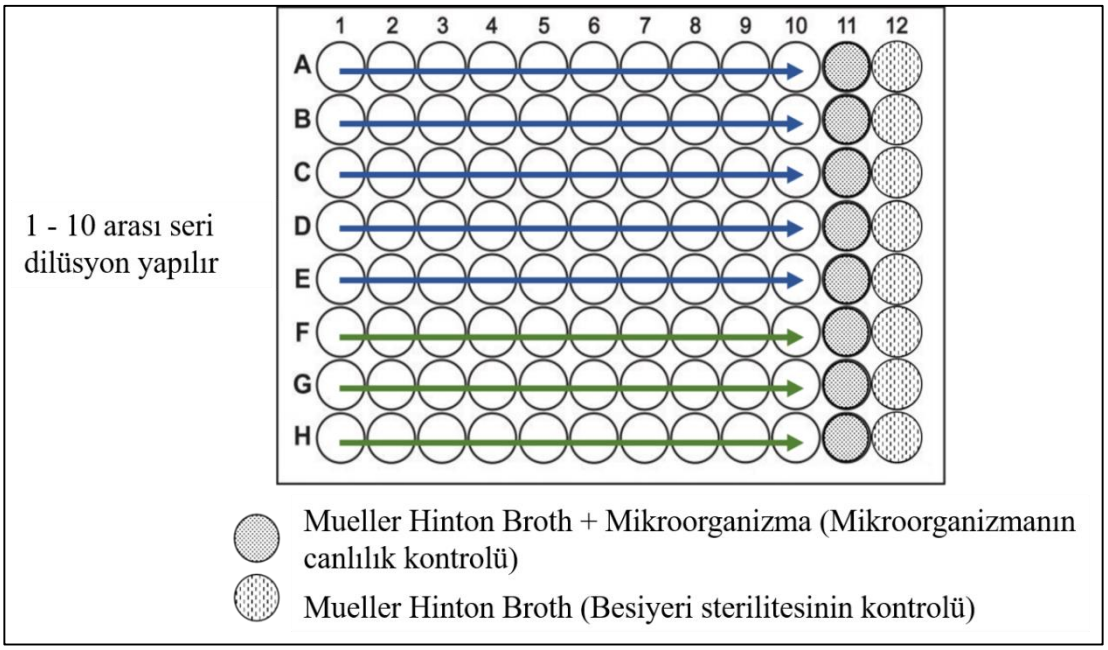
MİK, çıplak gözle değerlendirildiğinde inokülasyonun yapıldığı kuyucukta çok az üremenin veya bulanıklığın ihmal edilerek, gözle görünür büyümeyi tamamen inhibe eden en düşük ajan konsantrasyonudur.

Çoğu organizmayı inhibe eden konsantrasyonların üzerinde birkaç seyreltmede büyüyen az sayıda koloninin olduğu bir durum ile karşılaşıldığında bu konsantrasyonun etkili olup olmadığı bir kez daha araştırılmalıdır.

Çünkü dirençli varyantlar, β-laktamaz üreten organizmalar veya inkübasyonun uzaması durumunda, etken maddenin bozulmasına bağlı olarak duyarlı organizmaların yeniden büyümesi gözlenebilir.

Sülfonamidler ve trimetoprim ile yapılan çalışmalarda MİK testi artan konsantrasyona bağlı olarak büyümenin azalması şeklinde görülebilir ve MİK değerinin üzerindeki birkaç konsantrasyonda bir bulanıklık görülebilir (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2003).

MİK testinde kullanılan yöntem, bir tür seri seyreltme yaklaşımına dayanmaktadır (Şekil 1.5) (Altuner, 2019).



Şekil 1.5 MİK Testi

1.6.2 Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK)

Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK), belirli bir bakterinin öldürülmesi için gereken en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. MİK testi sonunda, MİK değerleri okunur ve sonrasında MİK ve MİK değerinin üzerinde üremenin olmadığı tüm kuyucukların içerikleri agar besiyerine pasajlanarak 24 saat inkübe edilir ve inkübasyon sonrasında MBK değeri belirlenir. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MBK olarak kabul edilir (Yilmaz, 2012).

1.7 Tezin Amacı

Tez çalışmasının amacı:

- 3 farklı makrofungustan, 4 ayrı çözücü ile elde edilmiş toplam 12 ekstraktın *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi,
- Makrofungus ekstraktlarının antibiyofilm aktivitelerinin gözlenmesi ve
- İnokulum miktarı, sıcaklık, pH, su aktivitesi (a_w) ve makrofungus ekstraktı varlığının hem *L. monocytogenes* gelişimi, hem de biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin gözlemlenmesidir.

2. KAYNAK TARAMASI

Literatürde, farklı parametrelerin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerindeki etkisini inceleyen birkaç çalışma vardır. Bu araştırmaların bir kısmı *in vitro* çalışmalar olsa da, çoğu farklı gıdalar üzerine yapılan çalışmalardır.

2.1 Sıcaklığın *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi

Gıda kaynaklı diğer birçok patojenden farklı olarak, *L. monocytogenes* optimum olarak yaklaşık 37°C'de üremek üzere geniş bir sıcaklık aralığında (1 ila 45°C) gelişme göstermektedir (Seeliger ve Jones, 1986; Azizoğlu vd., 2009).

Daha önce bahsedildiği gibi, *L. monocytogenes* -1,5 ila 45°C sıcaklık aralığında büyümektedir ve optimum sıcaklık 30 - 37°C'dir. Ancak, 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklar ise *L. monocytogenes* için öldürücüdür. *L. monocytogenes* 0°C'ye kadar düşük sıcaklıklarda üreyebildiği için, gıdaların soğutularak depolanması sırasında yavaş da olsa büyüme potansiyeline sahiptir (Lado ve Yousef, 2007; Kureljusic vd., 2019).

L. monocytogenes gıda işleme ve depolamasındaki düşük sıcaklıklar dâhil olmak üzere çeşitli stres koşullarıyla başa çıkabilmektedir. Bu nedenle, soğuk stresine adaptasyon mekanizmaları *Listeria*'nın temel bir becerisidir ve bu özelliği sayesinde buzdolabında saklanan gıdalarda minimum bulaşıcı seviyelere olsa bile hayatta kalır ve çoğalır (Santos vd., 2019).

L. monocytogenes 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda laboratuvar ortamında besiyerinde (Walker vd., 1990; Bajard vd., 1996) ve vakumlanarak paketlenen gıdalarda da (Hudson ve Mott, 1993; Bell vd., 1995; Tienungoon vd., 2000) ürediği belirtilmiştir. Ancak, *L. monocytogenes* için minimum üreme sıcaklıkları, çeşitli besiyeri ortamlarında 0,5 ila 5,0°C arası (Wilkins vd., 1972; Junttila vd., 1988; Duh ve Schaffner, 1993; Gill vd., 1997) ve gıdalarda 3 ila 4°C arası (Ross, 1993; Tienungoon, 1998; Membré vd., 1999; Tienungoon vd., 2000) olarak da bildirilmiştir.

2.2 pH Değerinin *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi

L. monocytogenes oldukça geniş bir pH aralığında üreme ve hayatta kalma yeteneğine sahiptir (Nolan vd., 1992).

Benkerroum ve Sandine (1988)'in yaptığı çalışmada *L. monocytogenes*'in 5,5 ila 7,0 arasındaki pH'da iyi ürediği gösterilmiştir. pH 5,0 iken üremenin yavaş olduğu, ancak tamamen engellenmediği görülmüştür. 24 gün sonra 1 mL'lik örneklerde *Listeria* bulunamamış; ancak bu pH değerinde 19. günde yeniden üreme ($6,3 \times 10^2$ hücre/mL) gözlenmiştir. pH'ın inhibisyon etkisi, pH değeri 4,5 ve altındayken net bir şekilde görülmüştür. Örneklerde pH 4,5 iken 48 saat sonra ve pH 3,5 olduğunda ise yalnızca 24 saat sonra patojen yok edilmiştir. 5,0'dan düşük pH değerlerinde yeniden üreme gözlenmemiştir.

Conner vd. (1986), *L. monocytogenes*'in 4,6'dan düşük pH değerlerinde tamamen inhibe edildiğini, ancak pH 5,6 olduğu durumda iyi ürediğini belirtmişlerdir.

Diğer taraftan Lovett vd. (1988), *L. monocytogenes*'in 4,5'ten düşük ve 9,4'ten yüksek pH seviyelerinde azalan canlılık sergilediğini belirtmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada *L. monocytogenes*'in üremesi için minimum pH değeri 4,3 olarak bildirilmiştir (George vd., 1988; Faber vd., 1992). *L. monocytogenes*'in Scott A ve L5 suşlarının HCl ile asitlendirilmiş ortamda sırasıyla 4,23 ve 4,25 gibi düşük pH değerlerinde büyüyebildiği bulunmuştur (Tienungoon, 1998; Tienungoon vd., 200).

Daha önce bahsedildiği gibi *L. monocytogenes* 4,0 - 9,6 gibi geniş bir pH aralığında büyüyebilmektedir. *L. monocytogenes*'in pH<4,0 olan besiyerlerinde büyüdüğü belirtilmemiş olsa da, asidik koşullara nispeten toleranslı görünmektedir. *L. monocytogenes* daha yüksek sıcaklıklarda, asidik koşullara daha duyarlı hale gelmektedir (Kureljusic vd., 2019).

George ve Levett (1990), *L. monocytogenes*'in pH değeri 3,9 olan taze lahana salatasında hayatta kalması ve üremesini, inokülasyon öncesinde lahana salatasının pH değeri 4,0; 5,0; 6,0 veya 7,0'a ayarlayarak üç farklı sıcaklıkta (4°C, 15°C ve 25°C)

incelemiştir. 5 günlük inkübasyon sonrasında, taze lahana salatasında veya pH değeri 4,0'a ayarlanan lahana salatasında *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir. Ayrıca, pH değeri 5,0 olan lahana salatasında, incelenen üç sıcaklıkta da *L. monocytogenes* inhibisyonu görülmüştür. pH değeri 6,0 olan lahana salatasında 4°C'de ve 15°C'de canlı *L. monocytogenes* sayısında düşüş meydana gelmiş, ancak, 25°C'de ise canlı *L. monocytogenes* sayısı başlangıçta artmış ve 25 günlük inkübasyon sonrasında yüksek kalmıştır. *L. monocytogenes*, incelenen üç sıcaklıkta da pH değeri 7,0 olan lahana salatasında hızla büyümüş, ardından, canlı sayısı aynı şekilde hızla düşmüştür.

George vd. (1988) 30°C, 20°C, 10°C, 7°C ve 4°C'de büyüme tespit edilen minimum pH değerlerinin sırasıyla 4,39; 4,39; 4,62; 4,62 ve 5,23 olduğunu gözlemlemişlerdir.

2.3 Su Aktivitesinin *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi

L. monocytogenes'in üremesi için gerekli minimum a_w değerinin genellikle inkübasyon sıcaklığının düşmesiyle arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, *L. monocytogenes*'in, NaCl'yi en iyi şekilde 15°C'de ürerken tolere ettiği görülmüştür. *L. monocytogenes*, 0,93'ün altındaki a_w değerlerinde üreyebilen, gıda kaynaklı birkaç patojenden biridir (Farber vd., 1992).

Korunmuş, işlenmiş et ürünleri ve çeşitli peynirlerde görülen listeriyoz salgınları, bu organizmanın yüksek NaCl konsantrasyonlarında bile üreyebildiğini göstermiştir (Nolan vd., 1992). Seeliger (1961), *L. monocytogenesis*'in %10 (w/w) NaCl'de üreyebildiğini ve %16 (w/w) NaCl içeren bir çözeltide bir yıl hayatta kaldığını göstermiştir.

Shahamat vd. (1980) ise, a_w değeri NaCl ile çeşitli düzeylerde ayarlanan besiyerlerinde bu organizmanın hayatta kalmasını incelemiş ve %13 (w/w) NaCl'de (37°C) canlılığın 10 gün içinde kaybolduğunu bildirmiştir. Saf su kullanılarak elde edilmiş %13 (w/w) NaCl içeren bir çözeltinin a_w değeri 25°C'de yaklaşık 0,91'dir. %30,5 NaCl'ye kadar olan daha yüksek tuz konsantrasyonlarında ise 37°C'de hayatta kalma süreleri yaklaşık 5 güne düşmüş, ancak NaCl'nin etkisinin daha düşük sıcaklıklarda azaldığı görülmüştür.

McClure (1989), yaptığı çalışmada gradyan NaCl plakaları kullanmış ve 20°C'de %8,8 (w/w) NaCl (0,94 a_w) ile üremenin engellendiğini, ancak inkübasyon sıcaklığı 25°C'ye yükseltildiğinde ise üreme görülen minimum NaCl yüzdesinin %9,9 (w/w) olduğunu belirtmiştir. Sıcaklık daha da artırılıp 30°C ve 35°C'ye getirildiğinde ise üreme için tolere edilebilir minimum sodyum klorürün konsantrasyonu %9,9 (w/w)'un üzerine yükselmiştir. Bu sonuçlar laboratuvar ortamında elde edilmiş olup, tuzlu lahana suyu gibi doğal substratlardan elde edilen veriler (Conner vd., 1986), bu materyallerde hayatta kalma ve üreme için gereken minimum a_w seviyelerinin biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Papageorgiou ve Marth (1989), yağsız süt ve peynir altı suyunda iki NaCl konsantrasyonunun *L. monocytogenesis* üzerindeki etkisini değerlendirmiş ve %6 (w/w) NaCl'de (0,96 a_w) her iki ortamda da üremenin gerçekleştiğini ve %12 (w/w) NaCl'de (0,92 a_w 4°C) en az 132 gün boyunca hayatta kaldığının gözlendiğini kaydetmişlerdir.

Daha önce de bahsedildiği gibi, makul derecede tuza toleranslı olan *L. monocytogenes*'in %13 - 14 sodyum klorürde üreyebildiği belirtilmiştir (Farber vd., 1992; Kureljusic vd., 2019). Tuz varlığında hayatta kalma durumu, saklama sıcaklığından etkilenmektedir. Çalışmalar, *L. monocytogenes*'in konsantre tuz çözeltilerinde hayatta kalma oranının, sıcaklığın düşmesiyle arttığını göstermiştir (Lado ve Yousef, 2007; Kureljusic vd., 2019).

2.4 İnokulum Miktarının *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerindeki Etkisi

Yapılan çalışmalar, düşük *L. monocytogenes* seviyelerinin, yani tüketim sırasında gıdada gramı başına 10^2 ila 10^3 CFU'yu geçmeyen seviyelerin, çoğu tüketici için düşük bir risk oluşturduğunu göstermektedir (CDCP, 1999; Gilbert vd., 1996; Tienungoon vd., 2000).

Almanya, Hollanda, Fransa ve Kanada gibi bazı ülkelerin ulusal düzenleyici makamları, gıda ürünlerinde raf ömrü boyunca *L. monocytogenes*'in kabul edilemez seviyelerde büyüyememesi koşuluyla, gıdalardaki düşük *L. monocytogenes*

seviyelerine tolerans içeren bir gıda güvenliği risk yönetimi stratejisini desteklemiş veya benimsemiştir (FAO, 1999; Tienungoon vd., 2000).

Koutsoumanis ve Sofos (2005), dört farklı *L. monocytogenes* inokulum miktarı (0,90; 2,58; 4,20 ve 6,81 log cfu/kuyucuk) ile inoküle edilmiş tryptic soy broth (TSB) besiyerinde bakterinin üreme/ürememe tepkileri, farklı sıcaklık (4 ila 30°C arası), pH (3,76 ila 6,44 arası) ve a_w (0,888 ila 0,997 arası) kombinasyonlarında 60 gün boyunca izlemiştir. Çalışmada 96 kuyucuklu plakalar kullanılmış ve üreme görsel olarak ve besiyerindeki bulanıklığın bir mikroplaka okuyucu ile kaydedilmesiyle izlenmiştir. Patojenin üreme sınırlarının inokulum miktarından etkilendiği bulunmuştur. Örneğin, 25°C ve a_w 0,997'de ve 4,45 ile 3,94 pH değerlerinde, üremenin sırasıyla 0,90 ve 6,81 log cfu/kuyucuk olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, 25°C ve pH 6,44'te üremenin gözlemlendiği minimum a_w değerleri inokulum miktarına bağlı olarak 0,900 ila 0,928 arasında değişmiştir. Sonuçlar, 10 ila 30°C arasındaki sıcaklıklarda, test edilen inokulum seviyeleri arasında gözlenen üreme limitlerindeki farkın, tek bir faktörün (pH veya a_w) inhibe edici olduğu ortamlarda, pH ve aw'nin birlikte inhibe edici olduğu ortamlara kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir.

2.5 *L. monocytogenes* Biyofilmini Etkileyen Faktörler

L. monocytogenes ile biyofilm oluşumu çok sayıda koşuldan etkilenmektedir. Sıcaklık (Moltz ve Martin, 2005; Di Bonaventura vd., 2008; Colagiorgi vd., 2017), tutunma yüzeyinin doğası ve hidrofobikliği (Midelet vd., 2006; Colagiorgi vd., 2017) biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu inceleyen çalışmaların çoğu, gıda işleme ortamlarına özgü düşük sıcaklıklardan daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşumu genellikle 37 ± 2°C, optimum büyüme sıcaklığı ve 25°C'de test edilmiştir. Di Bonaventura vd. (2008), farklı yüzeylerde 44 farklı *L. monocytogenes* izolatının biyofilm oluşumunu dört farklı sıcaklıkta (4, 12, 22 ve 37°C) analiz etmiştir. Araştırmacılar hem 22°C, hem de 37°C'de hücre sayısı ve üretilen HPM açısından karmaşık *L. monocytogenes* biyofilm organizasyonu gözlemlerken; hem 4°C, hem de 12°C'de seyrek hücre kümelerinden ve birkaç HPM'den oluşan ilkel bir biyofilm gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, bu

sonuçların farklı bir hücresel fizyolojiden değil, azalmış bakteri üremesinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Bu çalışmaya göre, *L. monocytogenes* 4°C ve 12°C'de daha hidrofobik olan paslanmaz çelik ve polistirene kıyasla cam üzerinde daha yüksek seviyelerde biyofilm oluşturabilmiştir. Bununla birlikte, yazarlar ayrıca 37°C'de 4°C'ye kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek biyofilm üretimi gözlemlemişlerdir. Tomičić vd. (2016) tarafından da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar, 25, 37 ve 42°C'de en düşük inkübasyon sıcaklığı olan 7°C'ye kıyasla *L. monocytogenes* suşlarının anlamlı düzeyde uyarılmış biyofilm oluşumunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca Chavant vd. (2002), *L. monocytogenes* LO28 suşunun, bir politetrafloroetilen (PTFE) yüzeyde 37°C'de kolonize olma yeteneği gösterdiğini, ancak bunun 8°C'de gözlemlenmediğini belirtmişlerdir.

Diğer taraftan, diğer bazı araştırmacılar ise buzdolabına benzer sıcaklıklarda biyofilm oluşumunu gözlemlemişlerdir. Örneğin, Bonsaglia vd. (2014), farklı yüzeylerde 4°C'de biyofilm oluşumunu gözlemlemiş ve polistirene göre paslanmaz çelik ve camda daha yüksek biyofilm seviyeleri görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca, Norwood ve Gilmour (2001), 4°C ve 30°C'de aynı şekilde tutunabilen iki *L. monocytogenes* izolatı bildirmiştir.

L. monocytogenes'in gıda işleme ve depolama sırasında kullanılan düşük sıcaklıklarda biyofilm üretme yeteneği çapraz kontaminasyon olasılığını artırmaktadır (Colagiorgi vd., 2017).

Kyere vd. (2020), hidroponik ve toprakta yetiştirilen marul yaprağı ekstraktlarının üç farklı *L. monocytogenes* suşu biyofilmi üzerindeki etkisini gözlemlemiştir. 4°C ve 10°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta inceleme yapan araştırmacılar, hidroponik ve toprakta yetişen yaprak ekstraktları arasında *L. monocytogenes* canlılığı, üremesi ve biyofilm oluşumu açısından anlamlı bir fark ($p < 0,05$) gözlememişlerdir. 10°C'de paslanmaz çelik üzerinde *L. monocytogenes* biyofilm oluşumu hem toprakta yetişen, hem de hidroponik yaprak özütleri için 3 log'dan 6,4-7,2 log CFU/cm^2'ye yükselmiştir. 4°C'de ise, hem toprakta yetişen hem de hidroponik yaprak özütleri için

üç suşun tamamında biyofilm oluşumu 4,3-4,8 log CFU/cm^2'ye yükselmiştir. Bu bulgular, marul yaprağı ekstraktlarının, kullanılan yetiştirme sisteminden bağımsız olarak paslanmaz çelik üzerinde *L. monocytogenes*'in hayatta kalmasını, üremesini ve biyofilm oluşumunu desteklediğini ve bunun, işleme ortamında tekrarlayan kontaminasyonun potansiyel bir nedeni olabileceğini göstermektedir. Araştırmacılar ayrıca *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşumunun hem 4°C, hem de 10°C'de zamanla arttığını ileri sürmüşlerdir.

2.6 Makrofungusların *L. monocytogenes* Üzerindeki Antibakteriyel Aktivitesi

Mevcut literatürde, *P. hartigii* ve *F. pinicola*'nın *L. monocytogenes* üzerindeki antibakteriyel aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Ancak *P. hartigii*'nin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili tek çalışma Altuner ve Akata (2010) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, bir çözücü kokteyli (dH_2O : etil alkol : metil alkol : aseton : CH_2Cl_2 (1:2,5:2,5:2:2) kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle çıkarılan *P. hartigii* ekstraktının *Candida albicans* ATCC 26555, *Escherichia coli* ETEC LM 63083, *Pseudomonas aeruginosa* (klinik izole), *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SL 1344 ve *Shigella flexneri* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Çalışma sonunda, *P. hartigii*'nin sadece *S. flexneri*'ye karşı aktif olduğunu gözlenmiştir.

Ayrıca, Dresch vd. (2015), *F. fometarius* ve *F. pinicola* etanol ekstraktlarının *E. coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *Bacillus subtilis* MB37'ye karşı antibakteriyel aktivitelerini MİK testi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak *F. fometarius* etanol ekstraktlarının 250 ile 500 µg/mL MİK değerleri ile sadece *S. aureus*'a karşı aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Diğer yandan, *F. pinicola* sırasıyla 31-125 µg/mL ve 31-500 µg/mL MİK değerleri ile *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı, antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Pala vd. (2019) de *F. pinicola* etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının *B. subtilis, S. aureus, E. coli, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesini agar kuyu difüzyon testi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak, etil asetat ve metanol ekstraktlarının tüm suşlara karşı antibakteriyel aktivite

gösterdiğini, ancak su ekstraktlarının test edilen suşların hiçbirinde aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Kolundžić vd. (2016), *F. fometarius* sikloheksan, diklormetan, metanol ve sulu ekstraktlarının *S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, B. subtilis, Enterococcus feacalis, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* ve *Salmonella abony*'e karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek üzere MİK testi ile bir çalışma yapmışlardır. Tüm ekstraktların 9 bakteri suşuna karşı minimum inhibitör konsantrasyonlarının 125-250 µg/mL aralığında olduğunu bulmuşlardır.

Orhan (2017), *F. fomentarius* ekstraktının *S. epidermis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 2392, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı antibakteriyel aktivitesini karşı disk difüzyon testi ile incelemiştir. Sonuç olarak, *F. fomentarius* ekstraktının tüm bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuştur.

2.7 Makrofungusların Antibiyofilm Aktiviteleri

Literatür tarandığında bu tez çalışmasında kullanılan makrofungusların sadece *L. monocytogenes* bakterisine karşı antibiyofilm aktivitesi ile ilgili değil, diğer hiçbir mikroorganizmanın biyofilm oluşumuna karşı etkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu sebeple bu tezden elde edilen bulguların herhangi bir veri ile karşılaştırılması mümkün değildir.

Ancak, literatürde aynı aileye ait başka mantarlar için yapılmış antibiyofilm çalışmaları bulunmaktadır. Karaca vd. (2020) *Polyporaceae* üyesi olan *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Cerioporus squamosus* (Huds.) Quél., *Trametes versicolor* (L.) Lloyd ve *Lentinula edodes* (Berk.) Singer makrofunguslarının %60'lık metanol ekstraktlarının *Enterococcus faecalis* (vajinal kültür izolatı) (EfVCI), *Enterococcus faecium* (üriner kateter izolatı) (EfUCI), *E. faecalis* NJ-3 (ATCC 51299) (EfNJ3) ve *E. faecium* NJ-1 (EfNJ1) suşlarına karşı antibiyofilm aktivitelerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre elde edilmiş ekstraktların hepsi farklı konsantrasyonlarda da olsa antibiyofilm aktivitesi göstermiştir. Burada en ilgi çekici sonuç, *L. edodes* ekstraktının

özellikle EfNJ3 ve EfNJ1 suşuna karşı çok düşük konsantrasyonlarda bile antibiyofilm aktivitesi göstermesidir.

Yang vd. (2013) yine bir *Polyporaceae* üyesi olan *Poria cocos* (Schw.) Wolf mantarının EtOAc ekstraktının *E. coli* U 07 suşuna karşı antibiyofilm aktivitesini çalışmış ve mantar ekstraktının konsantrasyona bağlı olarak *E. coli* biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini gözlemlemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Makrofungus Örnekleri

Bu çalışmada, *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat. ve *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst örnekleri kullanılmıştır. Makrofungus örnekleri sırasıyla İstanbul Belgrad Ormanı, Ilgaz Dağı Milli Parkı ve İzmit Yuvacık'tan toplanmış ve Doç. Dr. Ilgaz AKATA tarafından teşhis edilmiştir.

3.2 Araştırmada Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada gram pozitif bir bakteri olan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 kullanılmıştır.

3.3 Materyaller

3.3.1 Distile Su

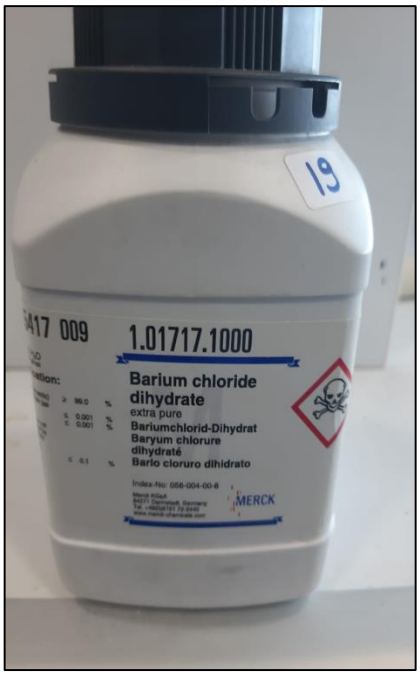
Sudaki yabancı maddeler giderilerek distile su üretilebilir. Bu nedenle, distile su bir tür arıtılmış sudur. Distile suda temelde hidrojen ve oksijenden başka hiçbir şey yoktur. Damıtma sırasında çoğu organik madde uzaklaştırılmakta ve sudaki mineraller alınmakta, böylece laboratuvar testleri için ideal bir çözücü haline gelmektedir. Bu tez çalışmasında distile su, bir distile su cihazı (Human Corporation, Kore) kullanılarak üretilmiş ve çalışmadaki tüm çözeltilerde ve besiyerinde kullanılmıştır.

3.3.2 Kimyasallar

3.3.2.1 Baryum klorür ($BaCl_2$)

Kimyasal formülü $BaCl_2$ olan baryum klorür inorganik bir bileşiktir. Baryumun en yaygın suda çözünür tuzlarından biridir. Diğer çoğu baryum tuzu gibi, beyaz, zehirli ve aleve tutulduğunda sarı-yeşil bir renk verir. Aynı zamanda higroskopiktir, ilk önce dihidrat $BaCl_2(H_2O)_2$'ye dönüşür. Ucuz olmasına rağmen, baryum klorürün

laboratuvarlarda ve sanayide uygulama alanı sınırlıdır. Baryum klorür sanayide esas olarak kostik klor tesislerinde tuzlu su çözeltisinin saflaştırılmasında ve ayrıca ısıl işlem tuzlarının üretiminde, çeliğin yüzey sertleştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında McFarland densitometresini kalibre etmekte kullanılan McFarland standartlarını hazırlamak üzere $BaCl_2$ (Merck, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Baryum klorür

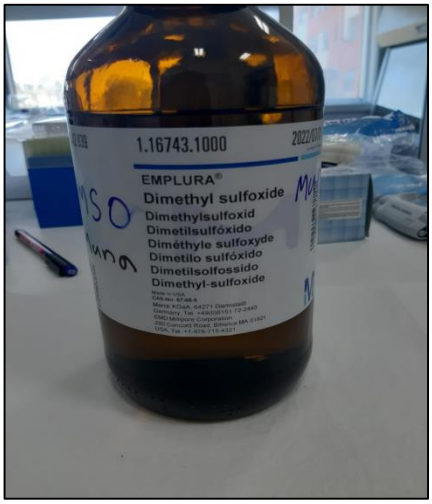
3.3.2.2 Sülfürik asit (H_2SO_4)

McFarland densitometresini kalibre etmek için McFarland standartlarını hazırlamak üzere $BaCl_2$ ile birlikte H_2SO_4 (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.3.2.3 Dimetil sülfoksit (DMSO)

DMSO, renksiz bir sıvı olan organosülfür $(CH_3)_2SO$ bileşiğidir ve hem polar, hem de polar olmayan bileşikleri çözen güçlü bir çözücüdür. Bu özellik, DMSO'yu çeşitli organik çözücüler ve su ile karışabilir hale getirir. DMSO, son derece polar yapısı nedeniyle güçlü bir çözücüdür. DMSO, iyonik bileşikler, belirli tuzlar ve iyonik olmayan bileşiklerle birlikte kullanılır. Polar olmayan bileşiklerle kullanımında bazı sınırlamalar vardır. DMSO, suda son derece zayıf çözünürlüğe sahip birçok maddeyi kolayca çözebilen polar, aprotik çözücü olarak kullanılır. DMSO organik sentezde

reaktif, endüstriyel çözücü, su ile karıştırıldığında antifriz veya hidrolik sıvı, kültürlenmiş hücrelerin dondurarak saklanması ve depolanması gibi amaçlarla kullanılmaktadır. DMSO (Merck, Almanya) bu tez çalışmasında, makrofungus ekstraktlarının stok çözeltilerini hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Dimetil sülfoksit

3.3.2.4 Sodyum klorür (NaCl)

Deneylerde kullanılan besiyerlerinin su aktivitelerini (a_w) ayarlamak amacıyla sodyum klorür (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.3.2.5 Tampon çözeltiler

Tampon çözeltiler, zayıf bir asit ve zayıf asidin konjuge bazını veya zayıf bir baz ve zayıf bazın konjuge asidini içeren bir karışımdan oluşan su bazlı çözeltilerdir. Tampon çözeltiler seyreltme veya küçük miktarlarda asit/alkali ilavesi ile çözeltinin pH'nın değişimine karşı dirençlidirler. Bu tez çalışmasında tampon çözeltiler iki farklı amaçla kullanılmıştır. Bu kullanımlardan biri, besiyerinin pH değerini ayarlamak için kullanılan pH metreyi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kalibre etmek için tampon çözelti kullanımıdır. Bunun için pH değerleri 4, 7 ve 10 olan standart tampon çözeltiler (Chembio, Türkiye) sipariş edilmiş ve pH metre kalibre edilmiştir. Tampon çözeltilerin bu tez çalışmasındaki diğer bir kullanım amacı ise besiyerlerinin pH'larının sabit tutulmasıdır. Bunun için tampon çözeltilerin hazırlanması ileride anlatılmıştır.



Şekil 3.3 Standart tampon çözeltiler

3.3.2.6 Kristal viyole boyası

Kristal viyole boyası histolojik bir boya olarak ve bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan Gram boyama yönteminde kullanılmaktadır. Kristal viyole boyası, antibakteriyel, antifungal, antihelmintik ve topikal antiseptik özelliklere sahiptir. Bu boyaya menekşe renginden dolayı bu isim verilmiştir. Bu tez çalışmasında biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kristal viyole boyası (Chembio, Türkiye) kullanılmıştır.



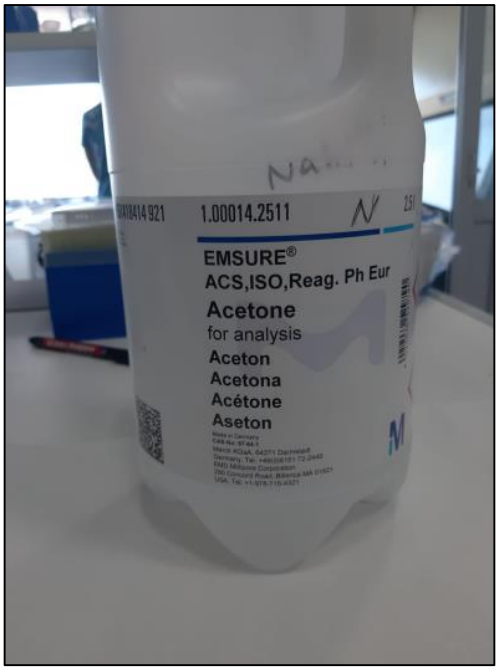
Şekil 3.4 Kristal viyole boyası

3.3.3 Ekstraksiyon İşleminde Kullanılan Çözücüler

Makrofungus örneklerinden aktif bileşiklerin ekstrakte edilmesi için farklı polaritelere sahip çözücüler kullanılmıştır.

3.3.3.1 Aseton

Aseton, laboratuvar dışında günlük hayatta da kullanılan bir çözücüdür. Aseton yaygın olarak benzin ve kozmetik ürünlerde katkı maddesi bileşeni olarak, yağı gidermek veya temizlemek için kullanılan bir çözücüdür. Bununla birlikte, bilimsel çalışmalar, farmasötik ekstraksiyonlar veya laboratuvar ekipmanlarının temizlenmesi ve sterilizasyonu için kullanılmaya uygundur. Bu tez çalışmasında, ekstraksiyon çözücülerinden biri olarak aseton (Merck, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.5 Aseton

3.3.3.2 Etil alkol

Kimyasal formülü C_2H_5OH ($CH_3{-}CH_2{-}OH$) olan etil alkol, EtOH olarak kısaltılan basit alkoldür. Hafif benzersiz kokusu olan uçucu, yanıcı ve renksiz bir sıvıdır. Tıp alanında antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılan etil alkol, kimyasal bir çözücü olarak ve organik bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadır.

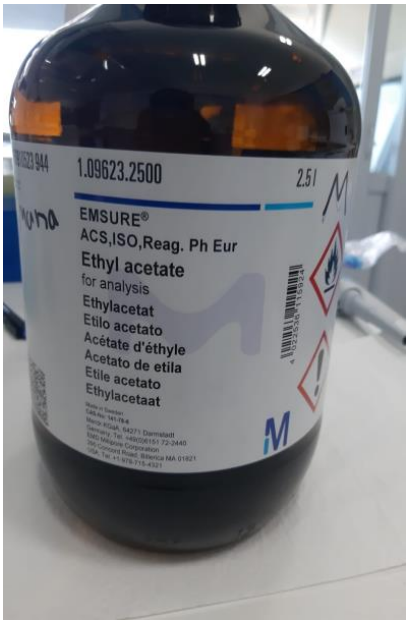
Bu tez çalışmasında, mikrobiyolojik çalışmalar sırasında yüzey dezenfeksiyonu (Markasız, Türkiye) ve makrofungus örneklerinden aktif bileşik ekstraksiyonu (Merck, Almanya) olmak üzere iki amaçla iki farklı kaynaktan temin edilen etil alkol kullanılmıştır.



Şekil 3.6 Yüzey dezenfeksiyonu için kullanılan etil alkol

3.3.3.3 Etil asetat

Kimyasal formülü $CH_3{-}COO{-}CH_2{-}CH_3$ olan etil asetatın (EtOAc) basitleştirilmiş formülü $C_4H_8O_2$'dir. Karakteristik tatlı bir kokusu olan bu renksiz çözücü, yapıştırıcılarda, oje çıkarıcılarda, çay ve kahvenin kafeinden arındırılması işleminde kullanılmaktadır. Etanol ve asetik asidin esteri olan EtOAc, bir çözücü olarak kullanılmak üzere büyük ölçekli olarak üretilmektedir. EtOAc, düşük maliyeti, düşük toksisitesi ve hoş kokusu nedeniyle tercih edilen bir çözücü ve seyreltici olarak kullanılmaktadır. Etil asetat içeren karışımlar, laboratuvarlarda genellikle kolon kromatografisinde ve ekstraksiyonlarında kullanılır. EtOAc; hidroliz, transesterifikasyon ve yoğunlaşma eğilimi gösterdiğinden nadiren bir reaksiyon çözücüsü olarak seçilir (ACS, 2021). Bu tez çalışmasında ekstraksiyon çözücülerinden biri olarak etil asetat (Merck, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.7 Etil asetat

3.3.3.4 Kloroform

Kloroform, belki de en yaygın kullanılan çözücülerdendir. Kloroform, triklorometan $CHCl_3$ olarak da bilinmektedir. Hızlı aktivite, kullanım kolaylığı ve düşük maliyet özelliklerinden dolayı diş hekimliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Her durumda sitotoksik etkiler oluşturabilen kloroform, potansiyel olarak kanserojendir (Poggio, 2017). Bu tez çalışmasında ekstraksiyon çözücülerinden biri olarak kloroform (Riedel de Haën, ABD) kullanılmıştır.

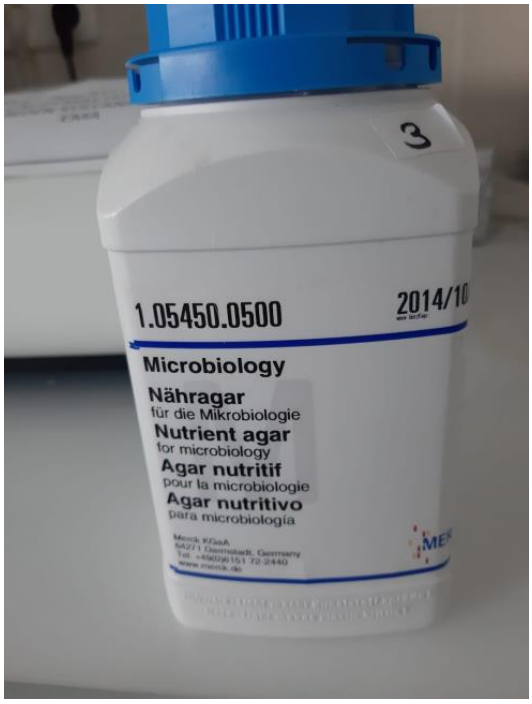


Şekil 3.8 Kloroform

3.3.4 Besiyerleri

3.3.4.1 Nutrient agar

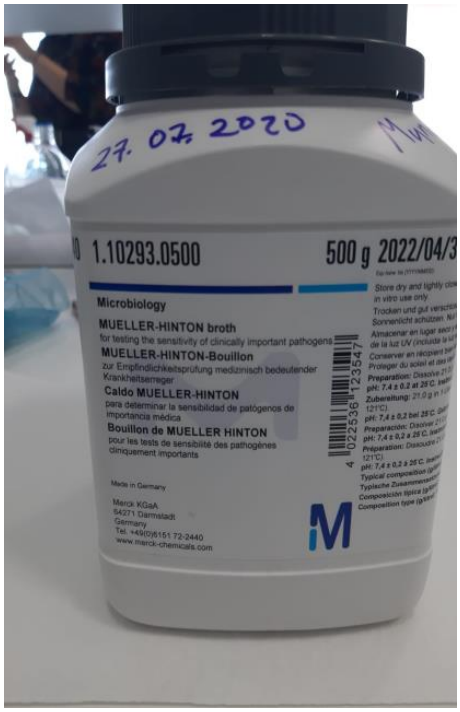
Nutrient agar (NA), birçok organizmanın büyümesini destekleyen, genel amaçlı bir kültür besiyeridir. Tipik olarak içeriğinde organik azot kaynağı olarak %0,5 (w/v) Pepton; vitamin, karbonhidrat, azot ve tuz içeriğini sağlamak için %0,3 (w/v) et özütü/maya özütü; %1,5 (w/v) agar; %0,5 (w/v) sodyum klorür ve distile bulunur. pH 25°C'de 6,8 olarak ayarlanır. Bu tez çalışmasında, nutrient agar (Merck, Almanya) *L. monocytogenes* stoklarının kültüre edilmesi için kullanılmıştır.



Şekil 3.9 Nutrient agar besiyeri

3.3.4.2 Mueller hinton broth besiyeri

Bu besiyeri, antibiyotik duyarlılık testi için yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir. Genel olarak içeriğinde 2,0 g et ekstraktı, 17,5 g kazein hidrolizat, 1,5 g nişasta ve distile su vardır. pH, 25°C'de nötr olarak ayarlanır. *Streptococcus* türleri üzerinde duyarlılık testi yapıldığında %5 koyun kanı ve nikotinamid adenin dinükleotid de eklenebilir. Bu tez çalışmasındaki minimum inhibisyon konsantrasyon testinde besiyeri olarak Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.10 Mueller hinton broth besiyeri

3.3.4.3 Nutrient broth besiyeri

Nutrient Broth besiyeri temel olarak, jelleştirici ajan olan agar içermeyen besiyeridir. Oda sıcaklığında sıvı haldedir ve genellikle mikroorganizmaları zenginleştirmek için kullanılır. Aynı zamanda zor gelişen organizmaları çoğaltmak için de kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında biyofilm testleri ve bakterinin stoktan alınarak zenginleştirilmesi için Nutrient Broth (NB) (Merck, Germany) besiyeri kullanılmıştır.

3.3.5 Laboratuvar Gereçleri

3.3.5.1 Pipet ipuçları

Sıvıların pipetle aktarılması için tek kullanımlık ve otoklavlanabilen pipet uçları kullanılmıştır. Her bir ucun kullanılabileceği hacim değişmektedir. Örneğin, 0,5 - 10µL, 2 -20 µL, 20 - 200µL ve 200 - 1000µL (1mL) hacimli farklı pipet uçları vardır. Pipet uçları polipropilenden yapılmıştır ve içeriği kolaylıkla görülebilir. Bu çalışmada, sarı (10-100 µL arasında hacme ayarlanabilen pipet için uygun) ve mavi (100-1000 µL arasında hacme ayarlanabilen pipet için uygun) olmak üzere iki tip pipet ucu kullanılmıştır.



Şekil 3.11 Pipet uçları (sarı ve mavi)

3.3.5.2 Petri kapları

Araştırmada, 94x16 mm boyutlarında plastik malzemeden (polistiren) yapılmış steril şeffaf kapaklı petri kapları kullanılmıştır. Bu petri kapları yaklaşık 80°C'ye kadar ısıya dayanıklıdırlar. Mikroorganizmaları geliştirmek için besiyeri dökmek için kullanılırlar. Tipik olarak katı veya yarı katı yüzeylerde büyüyen organizmaları geliştirmek için uygundurlar. Bu araştırmada kullanılan petri kapları FIRATMED'den (Türkiye) alınmıştır.



Şekil 3.12 Petri kapları

3.3.5.3 96 Kuyucuklu plakalar

96 kuyucuklu plakalar, çeşitli deneylerde küçük hacimlerde çalışmaya uygun, çok kuyucuklu dikdörtgen şeklinde düz bir mikroplakadır. Mikroplakalar, analitik araştırma ve klinik tanı testi laboratuvarlarında kullanılan standart bir laboratuvar gerecidir. Bir mikroplakada sıralar halinde dizilmiş 6, 24, 96, 384 veya hatta bazen 1536 kuyucuk olabilir. Bu tez çalışmasında, biyofilm testlerinde tabanı düz (TPP, İsviçre) ve minimum inhibisyon konsantrasyonu testinde U-tabanlı (Citotest, Çin) olmak üzere iki tip 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır.



Şekil 3.13 96 kuyucuklu mikroplaka (U-tabanlı)

3.3.5.4 Falcon test tüpleri

Çeşitli boyutlardaki örneklerin optik olarak kolay görüntülenmesine izin veren dereceli plastik Falcon test tüpleri, şeffaf polistiren plastik veya polistirenden üretilmiştir. Okunması kolay koyu mavi baskılı dereceler, büyük beyaz yazı bölümü ve kolay açılır/kapanır kapakları vardır. Bu tüpler kritik uygulamaların gerçekleştirilmesi için yüksek mukavemet ve geniş sıcaklık stabilitesi sağlar; santrifüjleme, vorteksleme ve dondurucuda uzun süreli saklama sırasında değerli örnekleri koruyabilirler. Bu tez çalışmasında, mikroorganizma inokulumunun hazırlanmasında steril ve tek kullanımlık plastik Falcon tüpleri (20 x 100 mm) (Tarsons, Hindistan) kullanılmıştır.



Şekil 3.14 Falcon test tüpleri

3.3.5.5 Steril plastik öze

İnokülasyon özesi, smear özesi, inokülasyon çubuğu veya microstreaker olarak da adlandırılan steril öze, esas olarak mikrobiyologlar tarafından bir mikroorganizma kültüründen küçük bir örneğin (inokulum) alınıp aktarılmasında kullanılan basit bir araçtır. Özenin ince bir sapı ve ucunda yuvarlak bir kısmı vardır. Başlangıçta bükülmüş metal telden (örneğin, platin veya tungsten) üretilmişlerdir, ancak günümüzde tek kullanımlık kalıplanmış plastik çeşitleri daha yaygındır. Bu tez çalışmasında inokülasyon için steril tek kullanımlık öze (Microloop, UK) kullanılmıştır.



Şekil 3.15 Steril plastik öze

3.3.5.6 Filtre kâğıtları

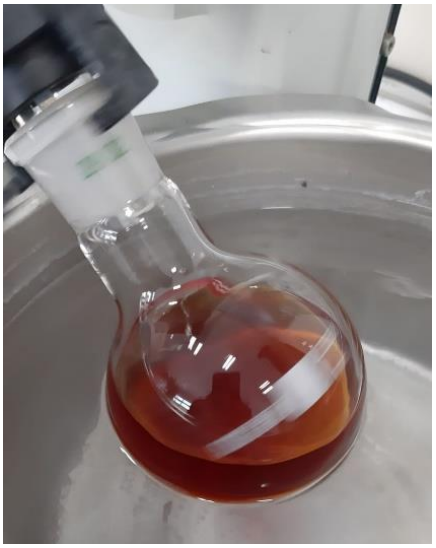
Filtre kâğıdı, sıvı veya hava akışına dik olarak yerleştirilmiş yarı geçirgen kâğıt bir bariyerdir. Filtreleme işlemi sırasında sıvılarda veya gazlarda bulunan özütlerden katı partikülleri ayırmak için kullanılır. Birçok özelliği vardır, önemli parametreleri ıslak mukavemet, gözeneklilik, partikül tutma, hacimsel debi, uyumluluk, kapasite ve verimliliktir. Kâğıtla filtrelemede hacim ve yüzey olmak üzere iki mekanizma vardır. Hacim filtrasyonu ile partiküller filtre kâğıdının büyük bölümünde yakalanır. Yüzey filtrasyonu ile partiküller kâğıt yüzeyinde yakalanır. Bu tez çalışmasında makrofungus ekstraktlarının filtrelenmesinde filtre kâğıdı (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır.



Şekil 3.16 Filtre kâğıdı

3.3.5.7 Buharlaştırma balonu

Buharlaştırma balonu, endüstride, döner buharlaştırıcılar ve kısa yollu damıtma düzenekleri gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Vakum uygulamaları için sağlam bir yüzeye ve dönüş sırasında sızıntıyı önleyecek dengeli bir yapıya sahiptir. Bu tez çalışmasında, ekstraksiyon çözücülerinin ekstraktlardan uzaklaştırılması için buharlaştırma balonları (S&H Labware, ABD) kullanılmıştır.



Şekil 3.17 Buharlaştırma balonu

3.3.6 Cihazlar

3.3.6.1 Çalkalayıcı

Çalkalayıcı, bir şişe veya tüp içindeki maddeleri sallayarak karıştırmak veya çalkalamak için kullanılan bir laboratuvar cihazıdır. Esas olarak biyoloji ve/veya kimya alanlarında kullanılmaktadır. Çalkalayıcıda, test tüplerinin, beherlerin veya erlenlerin yerleştirilmesine uygun hareketli bir yüzey vardır. Çalkalayıcı, büyük hacimli maddelerle çalışırken veya eş zamanlı çalkalama gerektiğinde tercih edilen bir cihazdır. Bu tez çalışmasında ekstraksiyon işlemlerinde standart bir laboratuvar çalkalayıcısı (Daihan, WiseShake, Kore) kullanılmıştır.



Şekil 3.18 Çalkalayıcı

3.3.6.2 Terazi

Tartılar (teraziler), laboratuvardaki nesnelerin ve/veya maddelerin ağırlıklarını belirlemek için kullanılan araçlardır. Bu tez çalışmasında ağırlığının ölçülmesine ihtiyaç duyulan bütün malzemelerin tartılması için bir terazi (Precisa, İsviçre) kullanılmıştır.



Şekil 3.19 Terazi

3.3.6.3 Mikroplaka okuyucu

Mikroplaka okuyucu, mikroplakalardaki örneklerin biyolojik, kimyasal veya fiziksel özelliklerini tespit etmek için kullanılan cihazlardır. İlaç/biyoteknoloji endüstrisi ve akademik kuruluşlarda araştırma, ilaç araştırmaları, biyoanaliz doğrulama, kalite kontrol ve üretim süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örnek reaksiyonları 1-1536 kuyucuklu mikroplakalarda test edilmektedir.

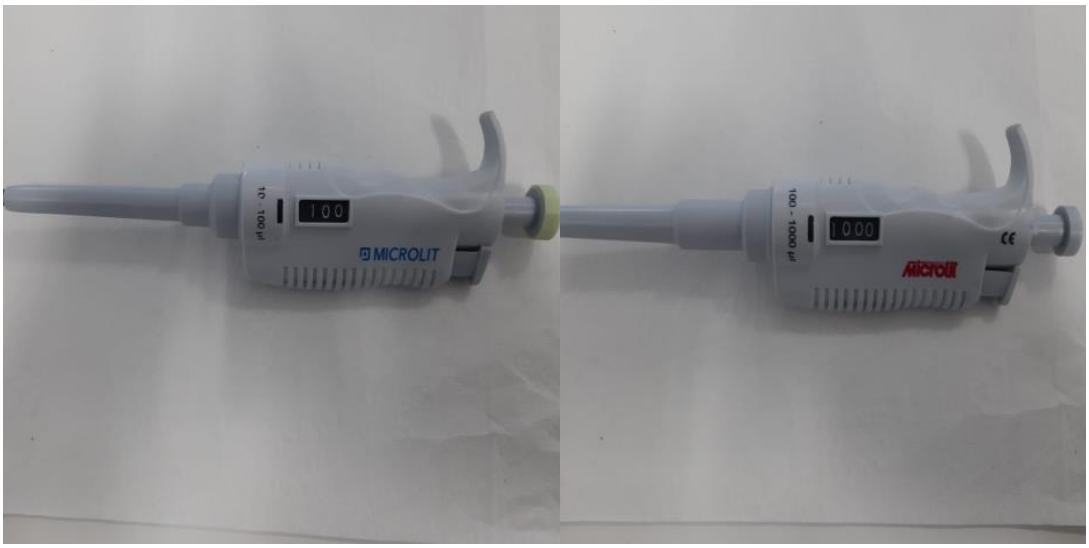
Klinik teşhis/akademik araştırma laboratuvarlarında en yaygın şekilde kullanılan modelleri, tipik reaksiyon hacmi 100-200 µL/kuyucuk olan 96 kuyucuklu olanlardır. Bu tez çalışmasında, mikroplaka okuyucu (Epoch 2 Bio-Tek) biyofilm oluşumunu belirlemek için kullanılmıştır.



Şekil 3.20 Mikroplaka okuyucu

3.3.6.4 Pipetler

Pipetler sıvıların aktarılmasında kullanılmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla besiyerinin inokülasyonunda kullanılırlar. Çeşitli boyutlarda pipetler mevcuttur. Bu tez çalışmasında besiyerinin transfer edilmesi, inoküle edilmesi ve ekstraktların aktarılmasında 10-100 µL ve 100-1000 µL olmak üzere iki farklı pipet (Microlit, Hindistan) kullanılmıştır.



Şekil 3.21 Pipetler

3.3.6.5 Otoklav

Otoklav, bir basınçlı kap içine yerleştirilen maddelerdeki zararlı bakteriler, virüsler, mantarlar ve sporları yüksek sıcaklık ve basınçta öldüren cihazdır. Sterilize edilecek malzemeler, belirli bir süre boyunca uygun sterilizasyon sıcaklığında ısıtılır. Bu tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve diğer malzemelerin sterilize edilmesinde otoklav (Daihan, Wiseclave, Kore) kullanılmıştır.



Şekil 3.22 Otoklav

3.3.6.6 İnkübatör

İnkübatör, mikrobiyolojik kültürlerin veya hücre kültürlerinin üretilmesi ve korunması için kullanılan bir cihazdır. Bu cihaz optimum sıcaklığı, nemi ve diğer koşulları, örneğin iç ortamındaki CO_2 ve oksijen içeriğini, korur. Hücre biyolojisi, mikrobiyoloji ve moleküler biyolojide deneysel çalışmalar için gerekli olan inkübatörler; hem bakteriyel, hem de ökaryotik hücrelerin kültüre edilmesi için kullanılmaktadır. Bazı inkübatörler, örneğin 100°C gibi, biraz daha yüksek değerlere çıkabilmesine rağmen, en basit inkübatörler, tipik olarak 60-65°C'ye kadar çıkan, ayarlanabilir bir ısıtıcıya sahip yalıtımlı cihazlardır. Hem bakteriler, hem de memeli hücreleri için en yaygın olarak kullanılan sıcaklık 37°C'dir, çünkü bu organizmalar bu koşullar altında daha iyi büyümektedir. Tomurcuklanarak çoğalan *Saccharomyces cerevisiae* mayası gibi biyolojik deneylerde kullanılan diğer organizmalar için 30°C'lik bir büyüme sıcaklığı

optimaldir. Bu tez çalışmasındaki inkübasyon işlemi için Selecta/İspanya firması tarafından üretilen inkübatör kullanılmıştır.



Şekil 3.23 İnkübatör

3.3.6.7 Döner buharlaştırıcı

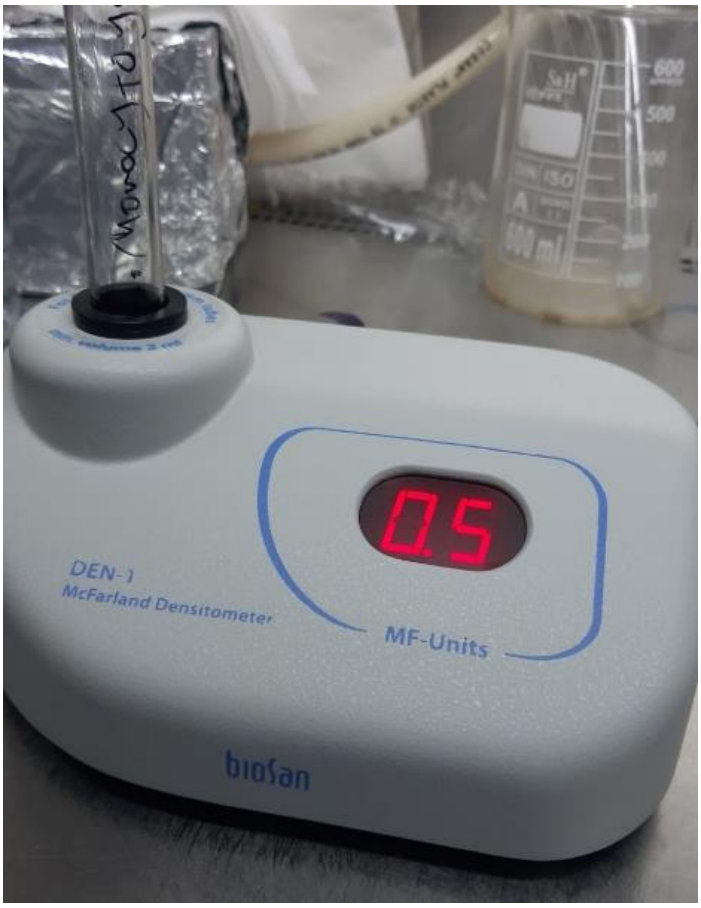
Döner buharlaştırıcı, çoğu kimya laboratuvarında çözücülerin buharlaştırma yoluyla örneklerden hızlı ve verimli bir şekilde çıkarılması için kullanılan cihazdır. Yani uçucu çözücünün, uçucu olmayan bileşikten ayrılmasını sağlar. Bu tez çalışmasında, ekstraktlardan ekstraksiyon çözücüsünün ayrılması için bir döner buharlaştırıcı (Heidolph, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.24 Döner buharlaştırıcı

3.3.6.8 McFarland densitometresi

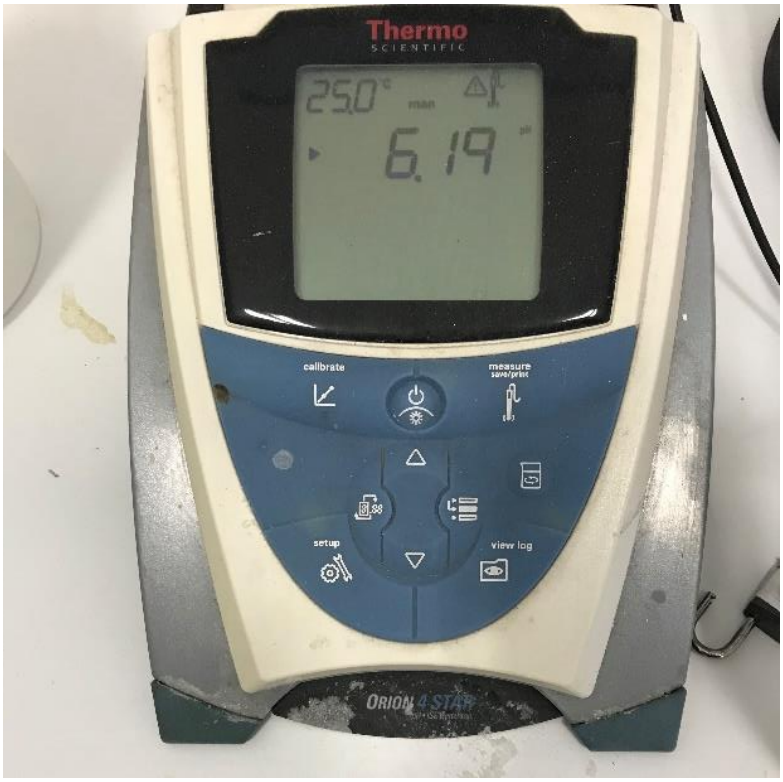
McFarland densitometresi, antibiyotiklere karşı mikroorganizma duyarlılığının belirlenmesi sırasında hücre konsantrasyonunun (bakteri, maya hücreleri gibi) ölçülmesi, çeşitli test sistemleri kullanarak mikroorganizmaların tanımlanması, ayrıca renk çözeltisinin konsantrasyonunun kantitatif tahmini ve yeşil ışığın absorbe edilmesi maksatlarıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, inokulum turbiditesinin 0,5 McFarland standardına ayarlanmasında McFarland densitometresi (Biosan, Letonya) kullanılmıştır.



Şekil 3.25 McFarland densitometresi

3.3.6.9 pH metre

Besiyerlerinin hazırlanması için kullanılacak olan tampon çözeltilerin pH değerini ayarlamak için bir pH metre (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır.



Şekil 3.26 pH metre

3.4 Yöntemler

3.4.1 Ekstraksiyon Prosedürü

Makrofungus örnekleri, laboratuvar tipi bir öğütücü (Christy ve Norris, Chelmsford, İngiltere) kullanılarak ince toz haline getirilmiştir.



Şekil 3.27 Öğütülmüş makrofungus örnekleri

10 g *F. fomentarius* tartılarak bir erlene konulup, üzerine 300 mL aseton ilave edilmiştir. Erlen, bir çalkalayıcıya (WiseShake, Kore) yerleştirilerek 3 gün boyunca 130 rpm'lik bir hızda oda sıcaklığında çalkalanmıştır (Şekil 3.28) (Cowan, 1999).



Şekil 3.28 Çalkalama ile ekstraksiyon

Üç gün sonra karışım filtre kâğıdı ile süzülerek buharlaştırma balonuna aktarılmıştır (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Filtre kâğıdı ile filtreleme işlemi

Bu balonlar döner buharlaştırıcıya (Heidolph, Almanya) bağlanmış ve örnekler 40 ila 50°C'de döndürülerek ekstraktlardaki çözücüler uzaklaştırılmış ve toz halinde ekstrakt elde edilmiştir (Şekil 3.30).



Şekil 3.30 Döner buharlaştırıcıyla çözücünün uzaklaştırılması

Aynı yöntem, etil alkol, kloroform ve etil asetat ile arka arkaya tekrarlanmış ve aynı adımlar *P. hartigii* ve *F. pinicola* için tekrar edilmiştir.

Ekstraktların kalıntıları 5 mL DMSO içinde çözülmüştür. DMSO stokları hava geçirmez kaplarda tutulmuş, ayrı ayrı etiketlenmiş ve kullanıma kadar -18°C'de saklanmıştır.

DMSO bakteriler için toksik olduğundan, ekstrakt stokları kullanımdan önce %1 DMSO içerecek şekilde seyreltilmiştir.

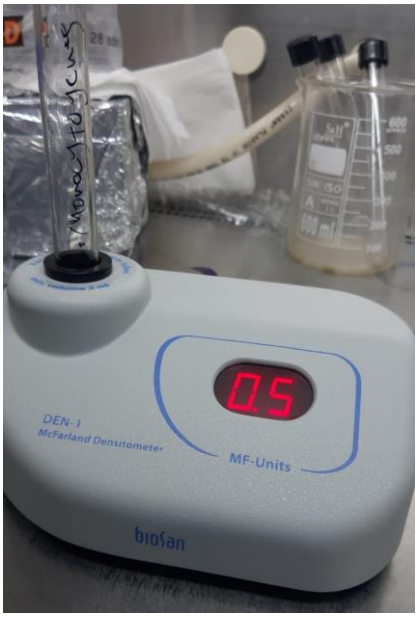
3.4.2 *Listeria monocytogenes*'in Kültüre Edilmesi

Çalışmalarda kullanmak üzere saf koloniler elde etmek için *L. monocytogenes* stoğu önce NB içinde 24 saat boyunca 37°C'de inkübe ederek zenginleştirilmiş, daha sonra bu kültür çizgi ekimle NA besiyerine aktarılarak yine 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.4.3 İnokulumun Hazırlanması

L. monocytogenes inokulumu, morfolojik olarak benzer kolonilerin NA besiyerinden steril tuzlu çözeltisine (%0,9 w/v) (serum fizyolojik) aktarılmasıyla hazırlanmış ve

McFarland Densitometresi (Biosan, Letonya) kullanılarak turbidite 0,5 McFarland'a ayarlanmıştır (Şekil 3.31).

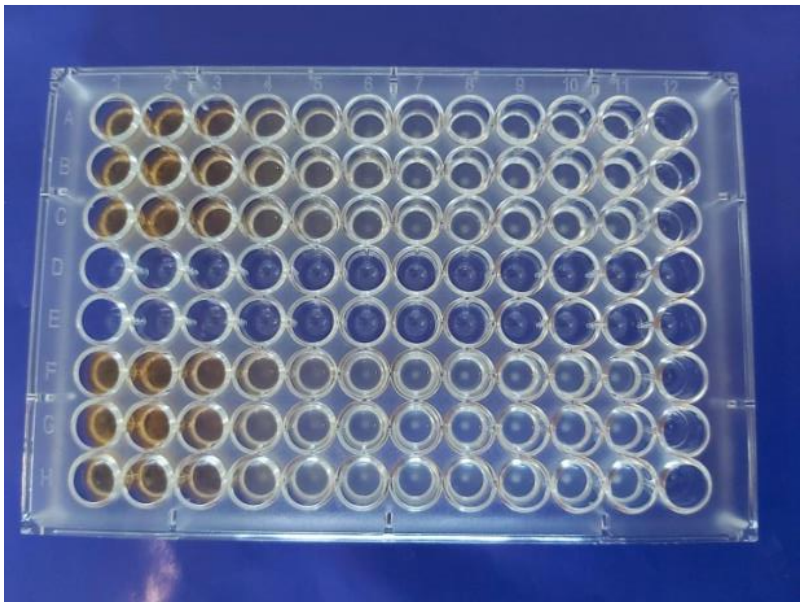


Şekil 3.31 İnokulum hazırlanması

3.4.4 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Testi

Başlangıçta 1'den 12'ye kadar numaralanan 96 kuyucuklu mikroplakanın tüm kuyucuklarına 100 µL MHB aktarılmıştır. Birinci kuyucuğa 100 µL ekstraktan aktarılarak dikkatli bir şekilde karıştırılmış ve 1 numaralı kuyucuktan 100 µL alınarak 2 numaralı kuyucuğa aktarılmıştır. 2 numaralı kuyucuğun içeriği dikkatli bir şekilde karıştırılmış ve ardından 2 numaralı kuyucuktan 100 µL alınarak 3 numaralı kuyucuğa aktarılmıştır. Bu seri mikrodilüsyon, 10 numaralı kuyucuğa kadar uygulanmış ve 10 numaralı kuyucuktan 100 µL alınarak dışarı atılmıştır. Seri seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra 12 numaralı kuyucuk dışındaki tüm kuyucuklara 50 µL inokulum aktarılmıştır. Yani, ekstraktların aktivitesini test etmek için 1 ila 10 numaralı kuyucuklar kullanılırken, 11 numaralı kuyucuk mikroorganizma için pozitif kontrol ve 12 numaralı kuyucuk ise MHB besiyerinin sterilitesinin kontrolü için negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.32).

96 kuyucuklu plakalar, 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), mikroorganizmanın görsel büyümesini tamamen inhibe eden en düşük ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır.



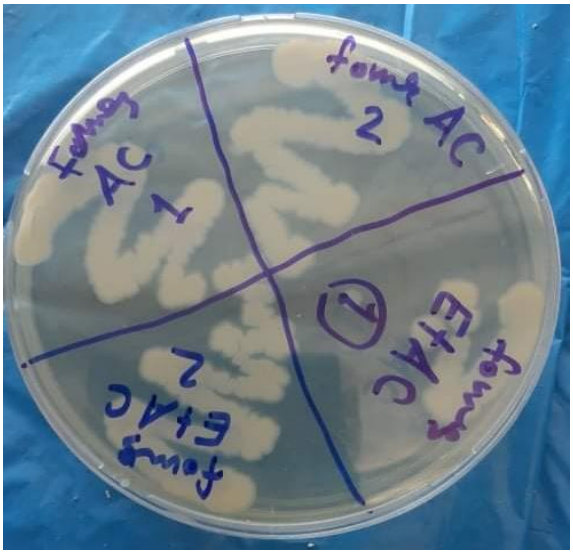
Şekil 3.32 MİK testi

3.4.5 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon Testi

MİK testinde, üreme görülmeyen kuyucukların içeriği bir öze yardımıyla NA besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir (Şekil 3.33). Daha sonra, agar plakaları üreme açısından çıplak gözle incelenmiştir. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), mikroorganizmanın büyümesini tamamen inhibe eden en düşük ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır (Şekil 3.34). Ekstraktların bakteriyostatik ve bakterisidal konsantrasyonlarını belirlemek için bu test kullanılmıştır.



Şekil 3.33 İnkübasyon



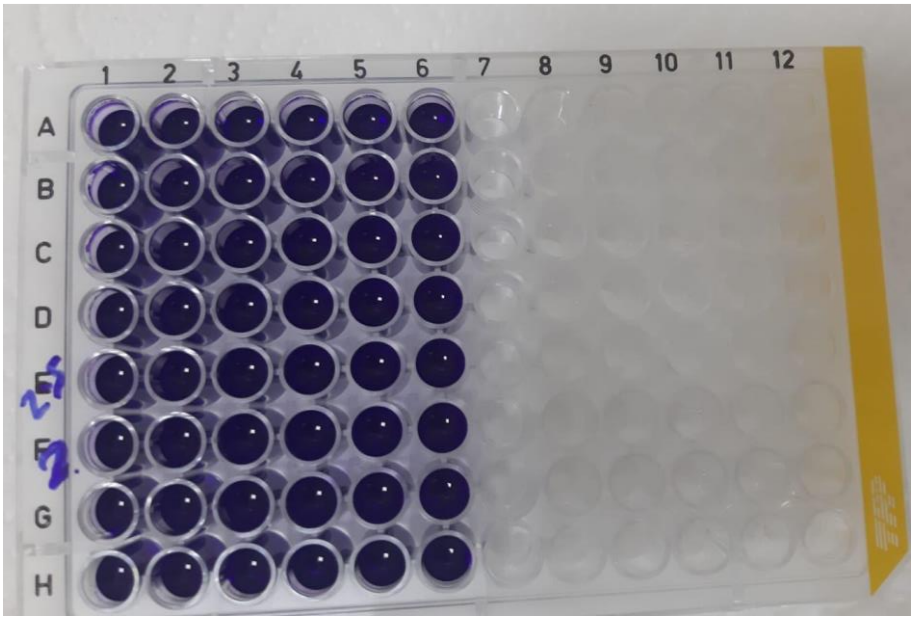
Şekil 3.34 MBK testi

3.4.6 Biyofilm Oluşum ve Ölçme Parametrelerinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm miktarları çeşitli parametrelerden etkilenebilmektedir. Bu parametrelerden iki tanesi glikoz konsantrasyonu ve inkübasyon süresidir (Karaca vd., 2020). Öte yandan oluşan biyofilmin ölçülmesinde kullanılacak mikroplakaların özelliği de önem taşımaktadır. Bu nedenle yapılan tez çalışmasında antibiyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere biyofilm oluşumunu en yüksek düzeye getiren glikoz konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin bulunmasının yanı sıra; gerek inkübasyonda, gerekse sonuçların okuması sırasında kullanılacak en uygun mikroplakanın tespit edilmesi için öncelikle bu parametrelerin biyofilm oluşumu ve okunması üzerine etkisi denenmiştir.

İlk olarak, mikroplakaların A sırasının 1 ila 5 arasındaki kuyucuklarına (5 tekrarlı sonuç gözlemlemek için) %0 glikoz içeren 100 µL NB besiyeri eklenmiştir. Daha sonra, B, C, D, E ve F sıralarındaki 1 ila 5'i arasındaki kuyucuklara sırasıyla %0,5; %1,0; %1,5; %2,0 ve %2,5 glikoz içeren 100 µL NB besiyeri eklenmiştir. G ve H sıraları ise sırasıyla pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır. H sırasındaki kuyucuklar dışındaki tüm kuyucuklara inokulum eklenmiştir. En iyi sonuç verecek 96 kuyucuklu plaka çeşidini belirlemek için yukarıda bahsedilen işlemler U-tabanlı ve tabanı düz plakalar olmak üzere iki farklı tür plaka için tekrarlanmıştır. Her iki tip mikroplakadan ikişer adet hazırlanmış; bunlardan biri 24 saat inkübe edilirken, diğeri 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon işleminden sonra mikroplakalar 2-3 kez steril distile su (sdH_2O) ile yıkanmış ve daha sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. *L. monocytogenesis*'in ürettiği biyofilmdeki bakteriyel biyokütlenin boyanması için, tüm kuyucuklara %0,1 (w/v) kristal viyole çözeltisi (Chembio, Türkiye) eklenmiş (Şekil 3.35) ve plakalar, oda sıcaklığında 15-30 dakika boyunca yeniden inkübe edilmiştir.



Şekil 3.35 Biyofilm testi

Daha sonra kuyucuklar tekrar sdH_2O ile iyice yıkanmış ve tamamen kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra oluşan biyofilm tarafından absorbe edilen kristal viyole boyasını çözmek için tüm kuyucuklara EtOH: aseton çözeltisi (70:30) aktarılmış ve oda sıcaklığında 15-30 dakika bir kez daha inkübe edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklardan EtOH: aseton çözeltisi temiz bir mikroplakaya aktarılmış ve biyofilmlerden elde edilen kristal viyole boyasının absorpsiyonu plaka okuyucu ile 550 nm'de belirlenmiştir.

Sonuçlara göre en iyi glikoz konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve 96 kuyucuklu plaka tipi seçilmiştir.

3.4.7 Antibiyofilm Aktivite Testi

Başlangıçta, test kuyucuklarını pozitif kontrol kuyucuğundan ayırmak için boş tutulan A10 ila H10 arasındaki kuyucuklar ve A11 ila H11 arasındaki kuyucuklar hariç olmak

üzere, bir önceki testte tabanı düz olan mikroplakanın daha iyi sonuç verdiği görüldüğü için 96 kuyucuklu tabanı düz plakanın tüm kuyucuklarına 100 µL NB besiyeri aktarılmıştır.

Sadece NB içeren 1 numaralı sütun, kültür besiyerinin sterilitesini kontrol etmek için negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 2 ila 5 numaralı sütunlar, 4 tekrarlı olarak ekstraktın antibiyofilm aktivitesini test etmek için kullanılmış; bu sebeple A2, A3, A4 ve A5'e 100 µL ekstrakt (bakterinin üremesini etkilememesi için MİK/2 konsantrasyonunda hazırlanmış) eklenmiştir. 2 kat seyreltme elde etmek için A2'den 100 µL içerik B2'ye aktarılmış ve aynı prosedür, H2'ye kadar A2 ila H2 arasında bir konsantrasyon aralığına ulaşana kadar yapılmıştır. Aynı prosedür A3, A4 ve A5 için de uygulanmıştır. Seri seyreltmeler tamamlandıktan sonra, A2 ve H5 arasındaki tüm kuyucuklara inokulum eklenmiştir.

6, 7, 8 ve 9 numaralı sütunlar, yukarıda belirtilen prosedürün birebir aynısı diğer bir ekstrakt için uygulanmıştır.

12 numaralı sütun, *L. monocytogenes*'in bu inkübasyon koşullarında herhangi bir ekstrakt olmadan üreyip üreyemediğini kontrol etmek için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Plakalar 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon işleminden sonra plakalar 2-3 kez sdH_2O ile yıkanmış ve daha sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. *L. monocytogenesis*'in ürettiği biyofilmdeki bakteriyel biyokütlenin boyanması için, tüm kuyucuklara %0,1 (w/v) kristal viyole çözeltisi (Chembio, Türkiye) eklenmiş ve plakalar, oda sıcaklığında 15-30 dakika boyunca yeniden inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar sdH_2O ile iyice yıkanmış ve tamamen kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra oluşan biyofilm tarafından absorbe edilen kristal viyole boyasını çözmek için tüm kuyucuklara EtOH: aseton solüsyonu (70:30) aktarılmış ve oda sıcaklığında 15-30 dakika bir kez daha inkübe edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklardan EtOH: aseton solüsyonu temiz bir plakaya aktarılmış ve biyofilmlerden elde edilen kristal viyole boyasının absorpsiyonu plaka okuyucu ile 550 nm'de belirlenmiştir.

3.4.8 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etkisi

Bazı parametrelerin *L. monocytogenes*'in üremesi ve biyofilm oluşumunu nasıl etkilediğini belirlemek için düşük, orta ve yüksek seviyelere sahip 5 faktör test edilmiştir. Faktörler ve düzeyleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 *L. monocytogenes*'in biyofilm gelişiminin değerlendirilmesinde kullanılan faktörler

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	+1
İnokulum Miktarı	0,5 McFarland	1,5 McFarland	2,5 McFarland
Sıcaklık	5°C	20°C	35°C
pH	4,0	5,0	6,0
a_w	0,997 (%0,5)	0,943 (%9)	0,888 (%15,5)
Ekstrakt konsantrasyonu	MİK/8	MİK/4	MİK/2

İnokulum miktarı için en yüksek seviye 2,5 McFarland, en düşük seviye 0,5 McFarland ve orta seviye ise 1,5 McFarland olarak seçilmiştir.

Sıcaklık için, en yüksek seviye 35°C, en düşük seviye 5°C ve orta seviye ise 20°C seçilmiştir.

pH değeri için en yüksek seviye 6,0; en düşük seviye 4,0 ve orta seviye ise 5,0 olarak seçilmiştir. Bu seviyeler, besiyerinin tampon kullanılarak hazırlanmasıyla sağlanmıştır.

Besiyeri hazırlanmasında kullanılacak tamponlar için pH değerini 3,0 ila 6,2 arasında tamponlayabilen fosfat-sitrat tamponu (pKa = 6,40) seçilmiştir. pH değeri 4,0 olan fosfat-sitrat tamponu aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- 480 mL dH_2O, mezür içine aktarılmış.
- Suya 8,24g disodyum hidrojen fosfat eklenmiştir.
- Daha sonra çözeltiye 7,75 g sitrik asit ilave edilmiştir.
- Tamponun pH değeri, HCl veya NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.

- Hacmi 600 mL'ye getirmek için yeteri kadar dH_2O su ilave edilmiştir.

pH değeri 5,0 ve 6,0 olan tamponların hazırlanmasında da aynı adımlar izlenmiş, ancak pH değeri 5,0 olan tampon için 11 gr disodyum hidrojen fosfat ve 6,12 gr sitrik asit ilave edilmiştir. pH değeri 6,0 olan tampon için ise 14,12 gr disodyum hidrojen fosfat ve 4,27 gr sitrik asit kullanılmıştır.

Besiyerlerine farklı miktarda NaCl ilave edilerek farklı su aktiviteleri elde edilmiştir (Şekil 3.36).



Şekil 3.36 Farklı pH ve aw değerlerine sahip besiyerleri

Faktörler ve bunların seviyelerinin etkisini gözlemlemek için aşağıda belirtildiği şekilde tam faktöriyel tasarımı uygulanmış (Tablo 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8) ve tüm koşullar üç tekrarlı olarak test edilmiştir.

Faktörlerin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi incelenirken, farklı sıcaklığa sahip durumların farklı inkübatörlere girme ihtiyacı bulunduğu için, mikroplakalar inkübasyon sıcaklıklarına göre üç ayrı gruba ayrılmıştır.

Deney tasarımında her bir kuyucuk bir kombinasyonu temsil edecek şekilde planlanmış ve uygulanmıştır.

Üç farklı inkübasyon sıcaklığı uygulandığı için, plakalar üreme durumları açısından 9 gün süreyle takip edilmiştir.

Tablo 3.2 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	0	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	-1	-1
4	-1	0	-1	-1	-1
5	0	0	-1	-1	-1
6	1	0	-1	-1	-1
7	-1	1	-1	-1	-1
8	0	1	-1	-1	-1
9	1	1	-1	-1	-1
10	-1	-1	0	-1	-1
11	0	-1	0	-1	-1
12	1	-1	0	-1	-1
13	-1	0	0	-1	-1
14	0	0	0	-1	-1
15	1	0	0	-1	-1
16	-1	1	0	-1	-1
17	0	1	0	-1	-1
18	1	1	0	-1	-1
19	-1	-1	1	-1	-1
20	0	-1	1	-1	-1
21	1	-1	1	-1	-1
22	-1	0	1	-1	-1
23	0	0	1	-1	-1
24	1	0	1	-1	-1
25	-1	1	1	-1	-1
26	0	1	1	-1	-1
27	1	1	1	-1	-1
28	-1	-1	-1	0	-1
29	0	-1	-1	0	-1
30	1	-1	-1	0	-1
31	-1	0	-1	0	-1
32	0	0	-1	0	-1
33	1	0	-1	0	-1
34	-1	1	-1	0	-1
35	0	1	-1	0	-1
36	1	1	-1	0	-1
37	-1	-1	0	0	-1
38	0	-1	0	0	-1

Tablo 3.3 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
39	1	-1	0	0	-1
40	-1	0	0	0	-1
41	0	0	0	0	-1
42	1	0	0	0	-1
43	-1	1	0	0	-1
44	0	1	0	0	-1
45	1	1	0	0	-1
46	-1	-1	1	0	-1
47	0	-1	1	0	-1
48	1	-1	1	0	-1
49	-1	0	1	0	-1
50	0	0	1	0	-1
51	1	0	1	0	-1
52	-1	1	1	0	-1
53	0	1	1	0	-1
54	1	1	1	0	-1
55	-1	-1	-1	1	-1
56	0	-1	-1	1	-1
57	1	-1	-1	1	-1
58	-1	0	-1	1	-1
59	0	0	-1	1	-1
60	1	0	-1	1	-1
61	-1	1	-1	1	-1
62	0	1	-1	1	-1
63	1	1	-1	1	-1
64	-1	-1	0	1	-1
65	0	-1	0	1	-1
66	1	-1	0	1	-1
67	-1	0	0	1	-1
68	0	0	0	1	-1
69	1	0	0	1	-1
70	-1	1	0	1	-1
71	0	1	0	1	-1
72	1	1	0	1	-1
73	-1	-1	1	1	-1
74	0	-1	1	1	-1
75	1	-1	1	1	-1
76	-1	0	1	1	-1

Tablo 3.4 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
77	0	0	1	1	-1
78	1	0	1	1	-1
79	-1	1	1	1	-1
80	0	1	1	1	-1
81	1	1	1	1	-1
82	-1	-1	-1	-1	0
83	0	-1	-1	-1	0
84	1	-1	-1	-1	0
85	-1	0	-1	-1	0
86	0	0	-1	-1	0
87	1	0	-1	-1	0
88	-1	1	-1	-1	0
89	0	1	-1	-1	0
90	1	1	-1	-1	0
91	-1	-1	0	-1	0
92	0	-1	0	-1	0
93	1	-1	0	-1	0
94	-1	0	0	-1	0
95	0	0	0	-1	0
96	1	0	0	-1	0
97	-1	1	0	-1	0
98	0	1	0	-1	0
99	1	1	0	-1	0
100	-1	-1	1	-1	0
101	0	-1	1	-1	0
102	1	-1	1	-1	0
103	-1	0	1	-1	0
104	0	0	1	-1	0
105	1	0	1	-1	0
106	-1	1	1	-1	0
107	0	1	1	-1	0
108	1	1	1	-1	0
109	-1	-1	-1	0	0
110	0	-1	-1	0	0
111	1	-1	-1	0	0
112	-1	0	-1	0	0
113	0	0	-1	0	0
114	1	0	-1	0	0

Tablo 3.5 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
115	-1	1	-1	0	0
116	0	1	-1	0	0
117	1	1	-1	0	0
118	-1	-1	0	0	0
119	0	-1	0	0	0
120	1	-1	0	0	0
121	-1	0	0	0	0
122	0	0	0	0	0
123	1	0	0	0	0
124	-1	1	0	0	0
125	0	1	0	0	0
126	1	1	0	0	0
127	-1	-1	1	0	0
128	0	-1	1	0	0
129	1	-1	1	0	0
130	-1	0	1	0	0
131	0	0	1	0	0
132	1	0	1	0	0
133	-1	1	1	0	0
134	0	1	1	0	0
135	1	1	1	0	0
136	-1	-1	-1	1	0
137	0	-1	-1	1	0
138	1	-1	-1	1	0
139	-1	0	-1	1	0
140	0	0	-1	1	0
141	1	0	-1	1	0
142	-1	1	-1	1	0
143	0	1	-1	1	0
144	1	1	-1	1	0
145	-1	-1	0	1	0
146	0	-1	0	1	0
147	1	-1	0	1	0
148	-1	0	0	1	0
149	0	0	0	1	0
150	1	0	0	1	0
151	-1	1	0	1	0
152	0	1	0	1	0

Tablo 3.6 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
153	1	1	0	1	0
154	-1	-1	1	1	0
155	0	-1	1	1	0
156	1	-1	1	1	0
157	-1	0	1	1	0
158	0	0	1	1	0
159	1	0	1	1	0
160	-1	1	1	1	0
161	0	1	1	1	0
162	1	1	1	1	0
163	-1	-1	-1	-1	1
164	0	-1	-1	-1	1
165	1	-1	-1	-1	1
166	-1	0	-1	-1	1
167	0	0	-1	-1	1
168	1	0	-1	-1	1
169	-1	1	-1	-1	1
170	0	1	-1	-1	1
171	1	1	-1	-1	1
172	-1	-1	0	-1	1
173	0	-1	0	-1	1
174	1	-1	0	-1	1
175	-1	0	0	-1	1
176	0	0	0	-1	1
177	1	0	0	-1	1
178	-1	1	0	-1	1
179	0	1	0	-1	1
180	1	1	0	-1	1
181	-1	-1	1	-1	1
182	0	-1	1	-1	1
183	1	-1	1	-1	1
184	-1	0	1	-1	1
185	0	0	1	-1	1
186	1	0	1	-1	1
187	-1	1	1	-1	1
188	0	1	1	-1	1
189	1	1	1	-1	1
190	-1	-1	-1	0	1

Tablo 3.7 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
191	0	-1	-1	0	1
192	1	-1	-1	0	1
193	-1	0	-1	0	1
194	0	0	-1	0	1
195	1	0	-1	0	1
196	-1	1	-1	0	1
197	0	1	-1	0	1
198	1	1	-1	0	1
199	-1	-1	0	0	1
200	0	-1	0	0	1
201	1	-1	0	0	1
202	-1	0	0	0	1
203	0	0	0	0	1
204	1	0	0	0	1
205	-1	1	0	0	1
206	0	1	0	0	1
207	1	1	0	0	1
208	-1	-1	1	0	1
209	0	-1	1	0	1
210	1	-1	1	0	1
211	-1	0	1	0	1
212	0	0	1	0	1
213	1	0	1	0	1
214	-1	1	1	0	1
215	0	1	1	0	1
216	1	1	1	0	1
217	-1	-1	-1	1	1
218	0	-1	-1	1	1
219	1	-1	-1	1	1
220	-1	0	-1	1	1
221	0	0	-1	1	1
222	1	0	-1	1	1
223	-1	1	-1	1	1
224	0	1	-1	1	1
225	1	1	-1	1	1
226	-1	-1	0	1	1
227	0	-1	0	1	1
228	1	-1	0	1	1

Tablo 3.8 Faktöryel tasarım

Deneme	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu
229	-1	0	0	1	1
230	0	0	0	1	1
231	1	0	0	1	1
232	-1	1	0	1	1
233	0	1	0	1	1
234	1	1	0	1	1
235	-1	-1	1	1	1
236	0	-1	1	1	1
237	1	-1	1	1	1
238	-1	0	1	1	1
239	0	0	1	1	1
240	1	0	1	1	1
241	-1	1	1	1	1
242	0	1	1	1	1
243	1	1	1	1	1

3.4.9 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi sadece bakteri üremesinin gözlemlendiği kombinasyonlarda test edilmiştir.

3.5 İstatistiksel Analiz

Yukarıda belirtildiği gibi, tüm testler en az üç kez tekrarlanmıştır. Bu tekrarlar arasındaki farklılıkların analiz edilmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir (p = 0,05). Ayrıca, ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in üremesi ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin analiz edilmesi için sırasıyla ikili (binary) lojistik regresyon analiz ve çok değişkenli regresyon analizi kullanılmıştır. Ayrıca her bir parametrenin biyofilm oluşumu üzerine etkisini gözlemlemek için pearson korelasyon analizi yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde R Studio versiyon 3.3.2 yazılımı kullanılmıştır (R Development Core Team, 2019).

4. BULGULAR

4.1 Ekstraksiyon Verimi

Makrofunguslardan elde edilen ekstraktlar daha önce detaylı olarak açıklandığı gibi 5 mL DMSO içinde çözülmüş ve ekstrakt stokları elde edilmiştir. 5 mL DMSO içinde çözülen ekstrakt miktarları gram cinsinden Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 5 mL DMSO içinde çözülmüş gram cinsinden ekstrakt miktarları

	Mantarlar		
Ekstraktlar	*F. fomentarius*	*P. hartigii*	*F. pinicola*
Aseton	0,057	0,140	0,401
Etil Alkol	0,361	0,221	2,527
Kloroform	0,160	0,169	2,826
Etil Asetat	0,132	0,018	1,994

Ekstraksiyon işlemlerinde tüm mantar ve çözücüler için 10 gram makrofungus örneği ile başlanmış ve Tablo 4.1'de verilen ekstrakt miktarları elde edilmiştir. Buna verilerden yola çıkarak ekstraksiyon verimi aşağıdaki formül ile hesaplanabilir.

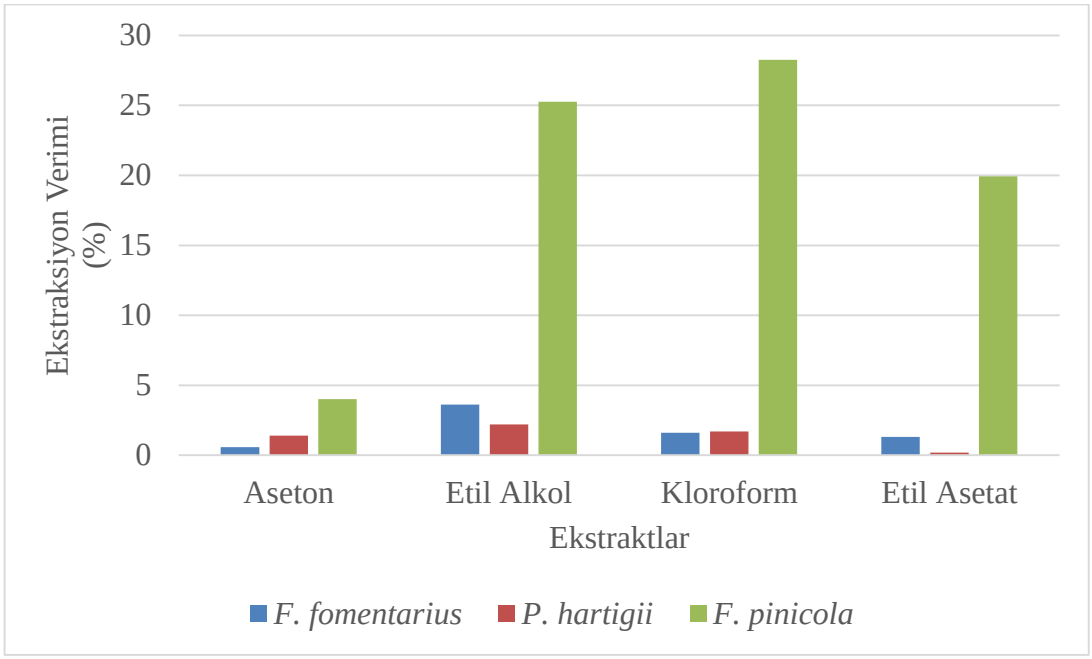
$$Ekstraksiyon\ verimi = \frac{Ekstrakt\ miktarı\ (gr.)}{Kullanılan\ örnek\ miktarı\ (10\ gr.)}\ x\ 100$$

Buna göre ekstraksiyon verimleri Tablo 4.2'de verildiği gibi bulunabilir.

Tablo 4.2 Ekstraksiyon verimi (%)

	Mantarlar		
Ekstraktlar	*F. fomentarius*	*P. hartigii*	*F. pinicola*
Aseton	%0,57	%1,40	%4,01
Etil Alkol	%3,61	%2,21	%25,27
Kloroform	%1,60	%1,69	%28,26
Etil Asetat	%1,32	%0,18	%19,94

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt miktarına göre hesaplanmış ekstraksiyon verimleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Ekstraksiyon verimi (%)

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiş olan verilere göre en yüksek ekstraksiyon verimi %28,26 ile *F. pinicola* kloroform ekstraktına aitken, en düşük ekstraksiyon veriminin %0,18 ile *P. hartigii* EtOAc ekstraktına ait olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1, ekstraksiyon veriminin ortalaması açısından analiz edilirse, verilmiş olan verilere göre en yüksek ekstraksiyon veriminin ortalaması %19,37 ile *F. pinicola* mantarından elde edilebilir. En düşük ekstraksiyon verimi ise ortalama %1,37 olarak *P. hartigii*'den hesaplanabilir.

F. fomentarius için elde edilen en yüksek ekstraksiyon verimi %3,61 ile EtOH ile elde edilen ekstraktta gözlenmişken, en düşük ekstraksiyon verimi %0,57 ile aseton ekstraktı için bulunmuştur.

P. hartigii için elde edilen en yüksek ekstraksiyon verimi %2,21 ile EtOH ile elde edilen ekstraktta gözlenmişken, en düşük ekstraksiyon verimi %0,18 ile EtOAc ekstraktı için bulunmuştur.

F. pinicola için elde edilen en yüksek ekstraksiyon verimi %28,26 ile kloroform ile elde edilen ekstraktta gözlenmişken, en düşük ekstraksiyon verimi %4,01 ile aseton ekstraktı için bulunmuştur.

Yine ortalama ekstraksiyon verimleri incelendiğinde ortalama %10.52 ile en yüksek ortalama ekstraksiyon veriminin kloroform ile elde edildiği görülürken, en düşük ortalama ekstraksiyon verimi ise %1,99 ile aseton için hesaplanmıştır. Bunların dışında ortalama ekstraksiyon verimi EtOH için %10,36 iken, EtOAc için %7.15 olarak hesaplanabilir.

Tablo 4.1'de verilen veriler 5 mL DMSO içinde çözünmüş gram cinsinden ekstraktları göstermektedir. Ekstrakt stok konsantrasyonları mg/mL olarak Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 Ekstrakt stok konsantrasyonları (mg/mL)

	Mantarlar		
Ekstraktlar	*F. fomentarius*	*P. hartigii*	*F. pinicola*
Aseton	11,4	28,0	80,2
Etil Alkol	72,2	44,2	505,4
Kloroform	32,0	33,8	565,2
Etil Asetat	26,4	3,6	398,8

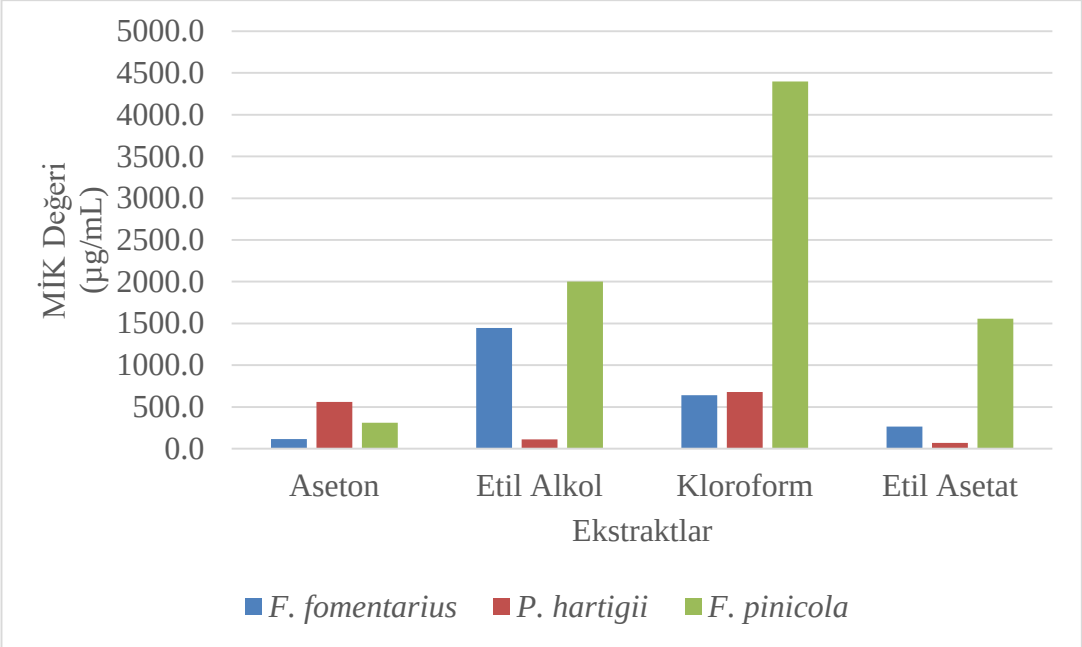
4.2 MİK Testi Sonuçları

Yapılan MİK testi sonucunda elde edilen MİK değerleri µg/mL olarak Tablo 4.4'te verildiği gibidir.

Tablo 4.4 ve Şekil 4.2'de verilmiş olan verilere göre en yüksek MİK değeri 4,4 mg/mL ile *F. pinicola* kloroform ekstraktına aitken, en düşük MİK değeri 70 µg/mL ile *P. hartigii* EtOAc ekstraktına ait olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.4 MİK testi sonuçları (µg/mL)

Ekstraktlar	Mantarlar		
	F. fomentarius	*P. hartigii*	*F. pinicola*
Aseton	114,2	559,6	310,0
Etil Alkol	1444,4	110,4	2000,0
Kloroform	638,8	677,6	4400,0
Etil Asetat	264,4	70,0	1557,8



Şekil 4.2 MİK testi sonuçları (µg/mL)

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1, MİK ortalama değerleri açısından analiz edilirse, verilmiş olan verilere göre en yüksek MİK ortalama değeri 2,067 mg/mL ile *F. pinicola* mantarından elde edilebilir. En düşük MİK ortalama değeri ise ortalama 354,4 µg/mL olarak *P. hartigii*'den hesaplanabilir.

F. fomentarius için elde edilen en yüksek MİK değeri 1,444 mg/mL ile EtOH ile elde edilen ekstraktta gözlenmişken, en düşük MİK değeri 114,2 µg/mL ile aseton ekstraktı için bulunmuştur.

P. hartigii için elde edilen en yüksek MİK değeri 677,6 µg/mL ile klorofom ile elde edilen ekstraktta gözlenmişken, en düşük MİK değeri 70,0 µg/mL ile EtOAc ekstraktı için bulunmuştur.

F. pinicola için elde edilen en yüksek MİK değeri 4,4 mg/mL ile kloroform ile elde edilen ekstraktta gözlenmişken, en düşük MİK değeri 310,0 µg/mL ile aseton ekstraktı için bulunmuştur.

Yine ortalama MİK değerleri incelendiğinde ortalama 1,9 mg/mL ile en yüksek ortalama MİK değerinin kloroform ile elde edildiği görülürken, en düşük ortalama MİK değeri ise 327,9 µg/mL ile aseton için hesaplanmıştır. Bunların dışında ortalama MİK değeri EtOH için 1,18 mg/mL iken, EtOAc için 630,7 µg/mL olarak hesaplanabilir.

4.3 MBK Testi Sonuçları

Yapılan MBK testi sonucunda elde edilen MBK değerleri µg/mL olarak Tablo 4.5'te verildiği gibidir.

Tablo 4.5'te verilmiş olan verilere göre en yüksek MBK değeri 252,7 mg/mL ile *F. pinicola* EtOH ekstraktına aitken, en düşük MİK değeri 559,6 µg/mL ile *P. hartigii* aseton ekstraktına ait olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.5 MBK testi sonuçları (µg/mL)

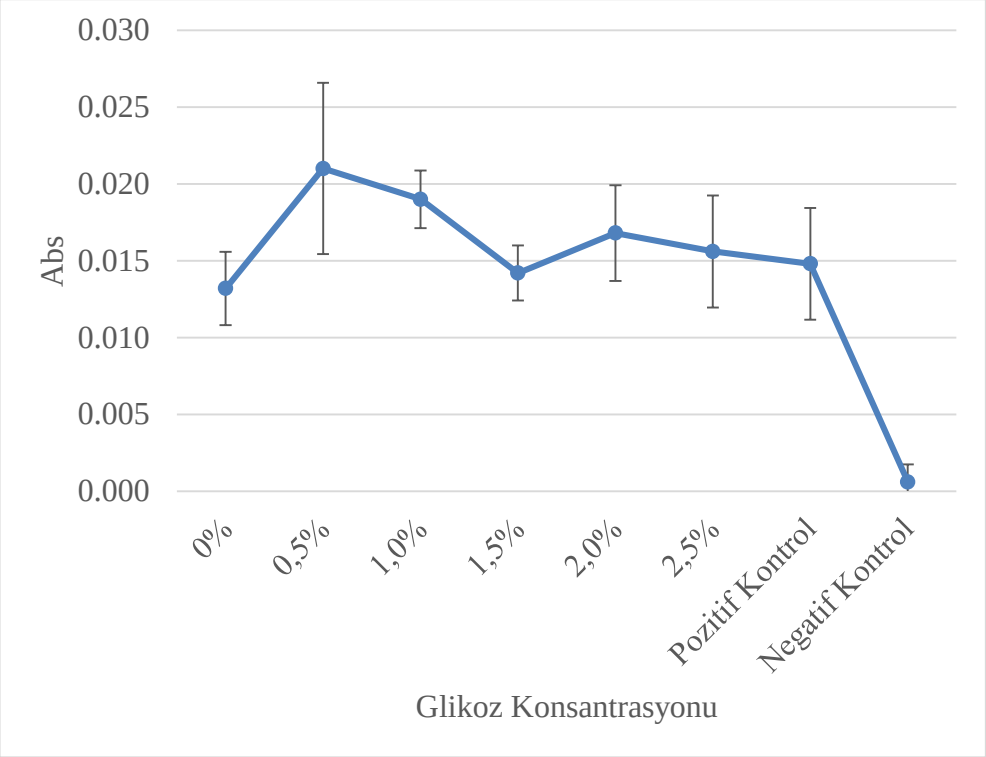
	Mantarlar		
Ekstraktlar	*F. fomentarius*	*P. hartigii*	*F. pinicola*
Aseton	>228,4	559,6	2500,0
Etil Alkol	>1444,4	>883,2	252700,0
Kloroform	>638,8	677,6	17700,0
Etil Asetat	>528,8	>70,0	6231,0

4.4 Biyofilm Oluşum ve Ölçme Parametrelerinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar

L. monocytogenes'in en yüksek biyofilm oluşumunu sağlamak için %0;%0,5; %1,0; %1,5; %2,0 ve %2,5 olmak üzere 6 farklı glikoz konsantrasyonu ve iki farklı (24 saat ve 48 saat) inkübasyon süresi denenmiştir. Bunlara ek olarak, gerek biyofilmin tutunması, gerekse sonuçların okunması sırasında hatanın minimize edilebilmesi için iki farklı (U-tabanlı ve tabanı düz) mikroplaka denenmiştir.

Deneyler sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6'da verilen sonuçlara göre Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 çizilmiştir.

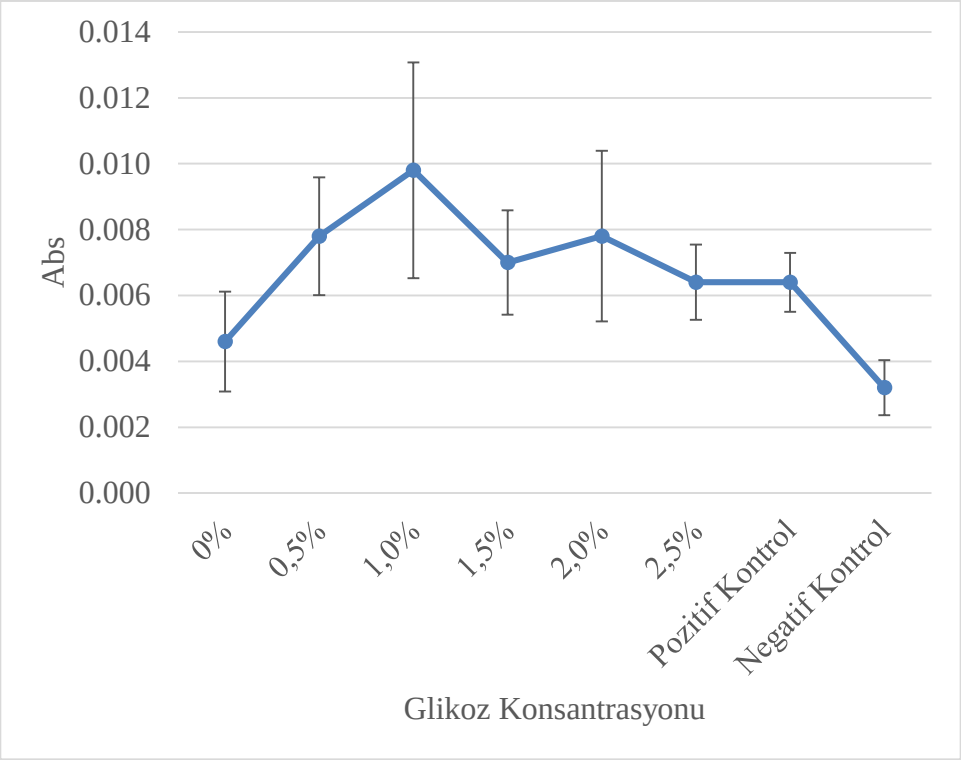


Şekil 4.3 Tabanı düz mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar

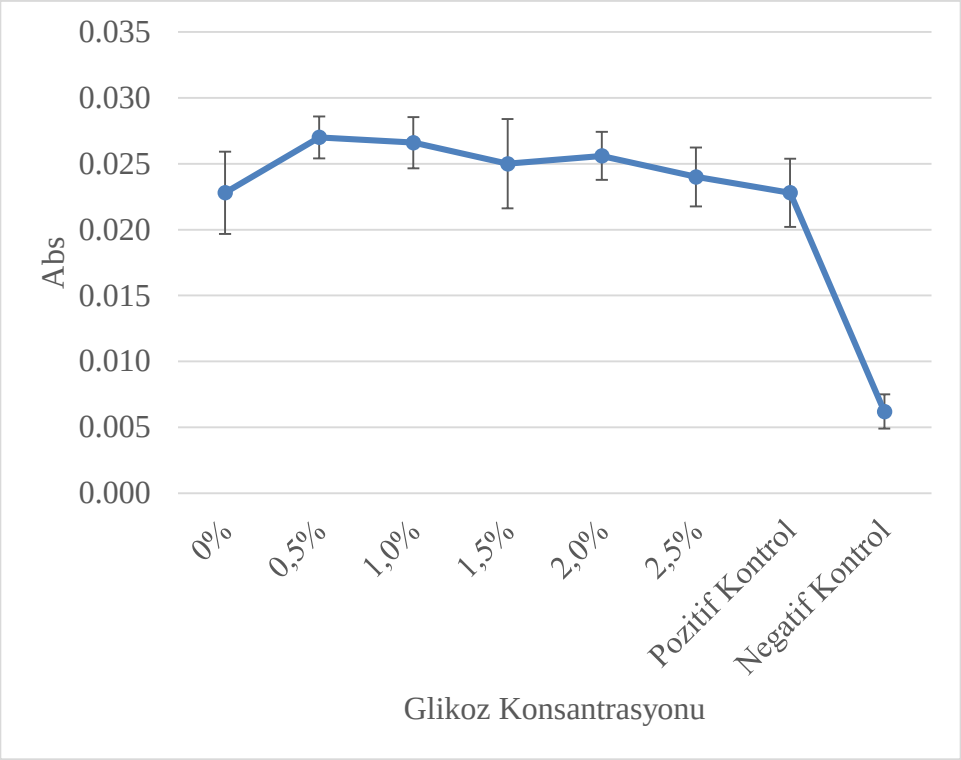
Tablo 4.6 Biyofilm oluşum ve ölçme parametrelerinin belirlenmesine ait sonuçlar

	24 Saat İnkübasyon Tabanı Düz Mikroplaka		24 Saat İnkübasyon U-Tabanlı Mikroplaka		48 Saat İnkübasyon Tabanı Düz Mikroplaka		48 Saat İnkübasyon U-Tabanlı Mikroplaka	
Glikoz (%)	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma
% 0	0,013	0,0024	0,005	0,0015	0,023	0,0031	0,016	0,0033
%0,5	0,021	0,0056	0,008	0,0018	0,027	0,0016	0,014	0,0019
%1,0	0,019	0,0019	0,010	0,0033	0,027	0,0019	0,013	0,0011
%1,5	0,014	0,0018	0,007	0,0016	0,025	0,0034	0,013	0,0018
%2,0	0,017	0,0031	0,008	0,0026	0,026	0,0018	0,013	0,0013
%2,5	0,016	0,0036	0,006	0,0011	0,024	0,0022	0,015	0,0038
Pozitif Kontrol	0,015	0,0036	0,006	0,0009	0,023	0,0026	0,013	0,0017
Negatif Kontrol	0,001	0,0011	0,003	0,0008	0,006	0,0013	0,003	0,0022

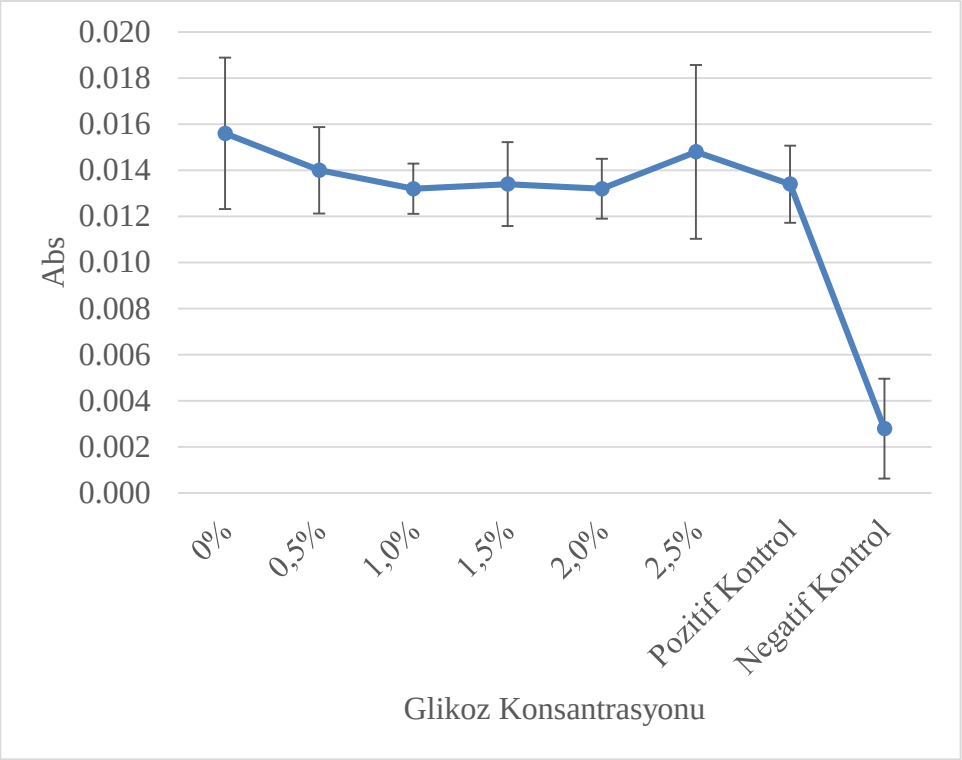
- Ortalama Abs.: Ortalama Absorbans
- Std. Sapma: Standart Sapma



Şekil 4.4 U-tabanı mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar



Şekil 4.5 Tabanı düz mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar

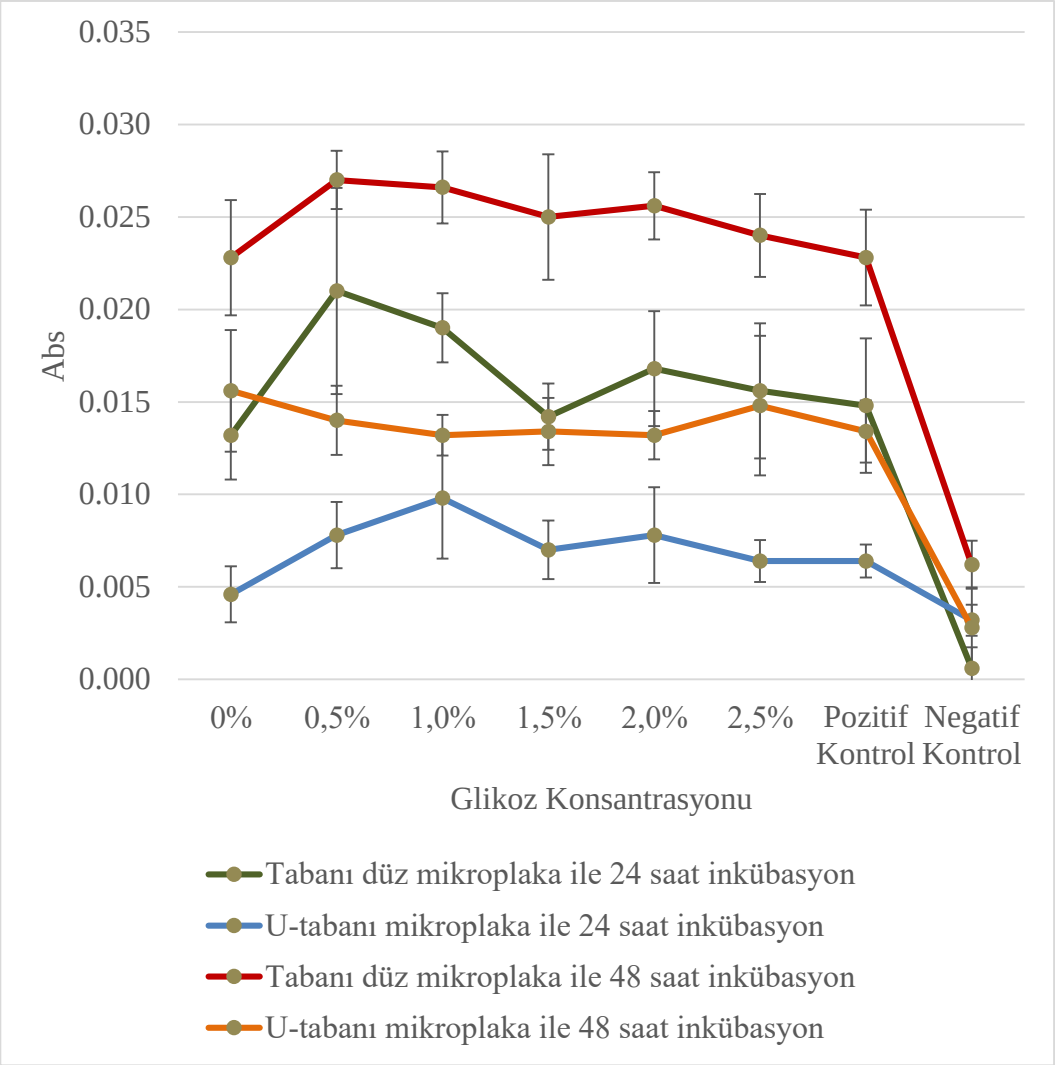


Şekil 4.6 U-tabanı mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçlar

Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiş olan grafikler birbiriyle karşılaştırılabilmesi amacıyla Şekil 4.7'de birleştirilmiştir.

Şekil 4.7 antibiyofilm çalışmasında kullanılması gereken biyofilm oluşum ve ölçme parametreleri açıkça göstermektedir. Elde edilen absorbans değerleri en yüksekten en düşüğe doğru sıralandığında sıralamanın tabanı düz mikroplaka ile yapılan 48 saatlik inkübasyon > tabanı düz mikroplaka ile yapılan 24 saatlik inkübasyon > U-tabanlı mikroplaka ile yapılan 48 saatlik inkübasyon > U-tabanlı mikroplaka ile yapılan 24 saatlik inkübasyon şeklinde olduğu görülmektedir. Bu gözlem sonucunda antibiyofilm çalışmasında seçilmesi gereken iki parametreyi açıkça göstermektedir.

Buna göre, her iki mikroplaka için de biyofilm oluşum miktarının, 24 saatlik inkübasyon ile karşılaştırıldığında 48 saat inkübasyon sonrasında daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sebeple antibiyofilm çalışmasında inkübasyon süresinin 48 saat olması gerektiği kararlaştırılmıştır.



Şekil 4.7 Biyofilm oluşum ve ölçme parametrelerinin belirlenmesine ait birleştirilmiş sonuçlar

Öte yandan, her iki inkübasyon süresi için de tabanı düz mikroplakanın daha iyi sonuç verdiği gözlendiği için antibiyofilm çalışmasında tabanı düz mikroplakanın kullanılması daha uygun bulunmuştur.

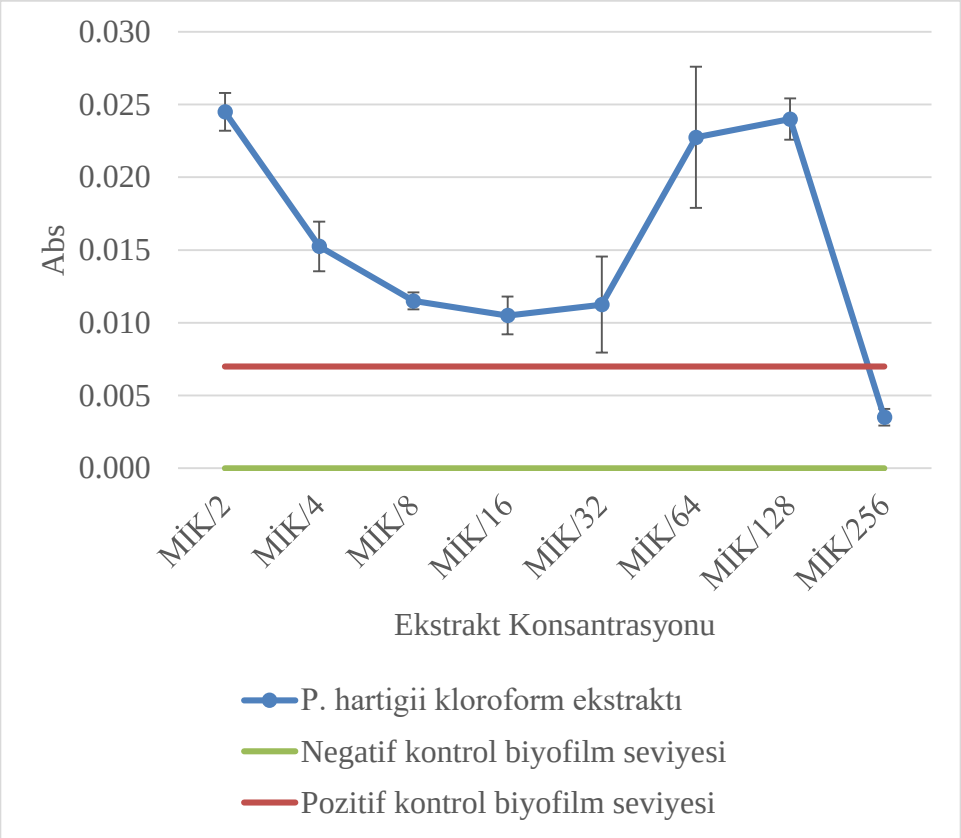
Buna ek olarak, yine Şekil 4.7 incelendiğinde tabanı düz mikroplakada 48 saatlik inkübasyon için en yüksek absorbansın %0,5 glikoz konsantrasyonu için olduğu görülebilir. %0,5 glikoz konsantrasyonu tabanı düz mikroplakada 24 saatlik inkübasyon için de en yüksek absorbansı vermektedir. Bu sebeple antibiyofilm çalışmasında kullanılacak besiyerindeki glikoz konsantrasyonunun %0,5 olmasına karar verilmiştir.

4.5 Antibiyofilm Aktivitesi Sonuçları

Bu tez çalışmasında 3 makrofungustan (*F. fomentarius*, *P. hartigii* ve *F. pinicola*) 4 çözücü (aseton, etil alkol, kloroform ve etil asetat) kullanılarak elde edilen 12 adet ekstraktın antibiyofilm aktiviteleri de incelenmiştir. Antibiyofilm çalışmasında kullanılan ekstraktın *L. monocytogenes*'in üremesini etkilememesi için MİK sonuçlarına bakılarak MİK/2 değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar seçilmiştir. Yapılan ön taramada 12 adet ekstrakttan sadece 3 tanesinin *L. monocytogenes* biyofilm oluşumunu etkilediği tespit edilmiştir. Bu üç ekstrakt, *P. hartigii*'den kloroform ve asetonla elde edilmiş ekstraktlar ile *F. pinicola*'dan kloroform ile elde edilmiş ekstraktlardır.

Bu üç ekstraktın farklı konsantrasyonlarına ait absorbanslarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7'de verilen sonuçlara göre Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 çizilmiştir.

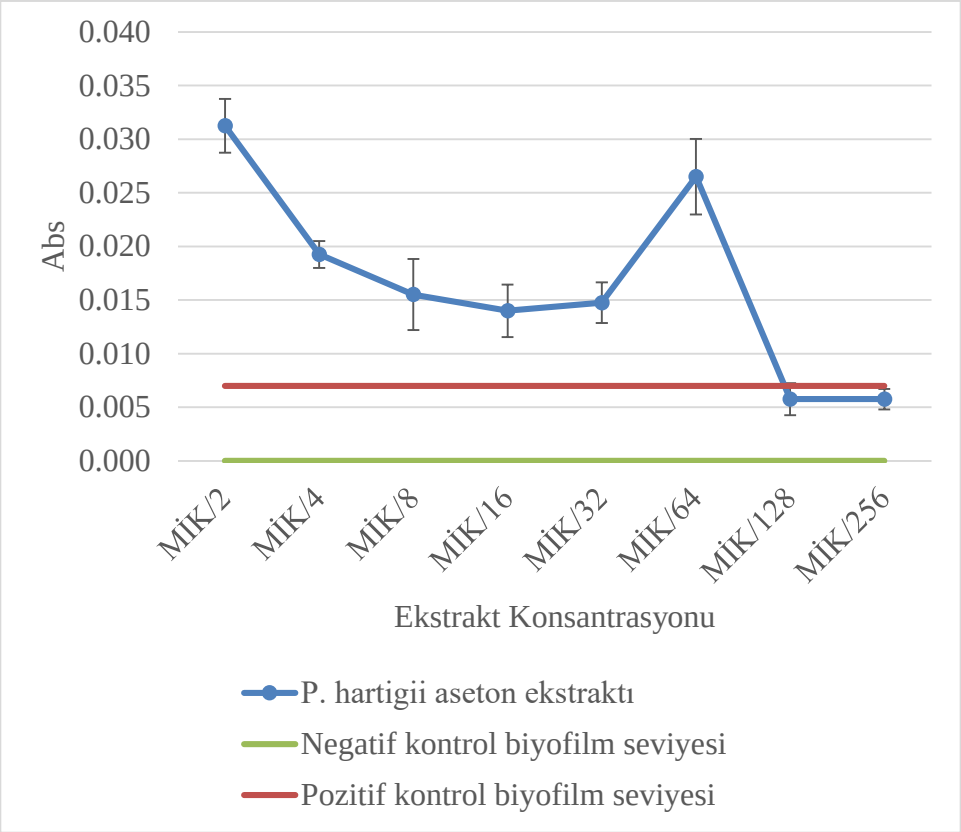


Şekil 4.8 *P. hartigii* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesi

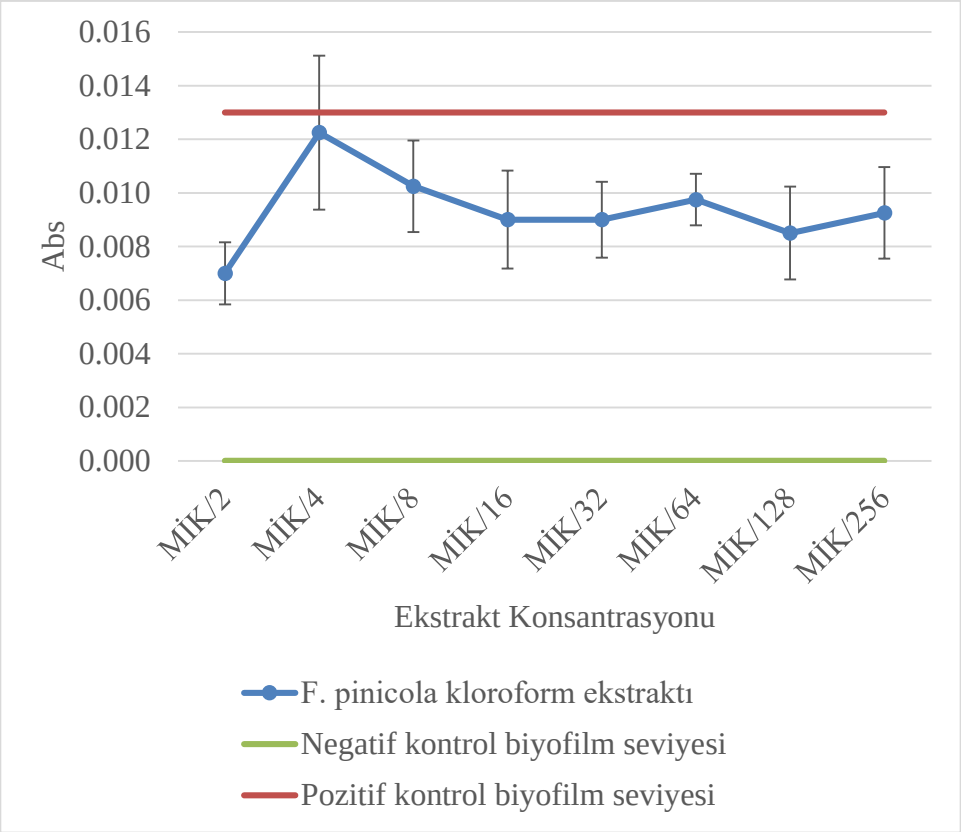
Tablo 4.7 Üç ekstraktın farklı konsantrasyonlarına ait biyofilm absorbanslarının ortalamaları ve standart sapmaları

Konsantrasyon	*P. hartigii* kloroform ekstraktı		*P. hartigii* aseton ekstraktı		*F. pinicola* kloroform ekstraktı		Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol	
	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma	Ortalama Abs.	Std. Sapma
MİK/2	0,025	0,001	0,031	0,003	0,007	0,001				
MİK/4	0,015	0,002	0,019	0,001	0,012	0,003				
MİK/8	0,012	0,001	0,016	0,003	0,010	0,002	0,000[1]	0,0011[1]	0,007[1]	0,0017[1]
MİK/16	0,011	0,001	0,014	0,002	0,009	0,002				
MİK/32	0,011	0,003	0,015	0,002	0,009	0,001				
MİK/64	0,023	0,005	0,027	0,004	0,010	0,001				
MİK/128	0,008	0,012	0,006	0,002	0,009	0,002	0,000[2]	0,0012[2]	0,013[2]	0,0011[2]
MİK/256	0,004	0,001	0,006	0,001	0,009	0,002				

[1] *P. hartigii* kloroform ve aseton ekstraktlarının bulunduğu mikroplakada gözlenen veriler.
[2] *F. pinicola* kloroform ekstraktının bulunduğu mikroplakada gözlenen veriler.



Şekil 4.9 *P. hartigii* aseton ekstraktının antibiyofilm aktivitesi



Şekil 4.10 *F. pinicola* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesi

4.6 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etkisi İle İlgili Sonuçlar

Faktörlerin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi incelenirken, daha önce de bahsedildiği gibi sıcaklık parametresi sınırlayıcı olduğundan deney tasarımı sıcaklığa göre planlanmıştır. Çünkü farklı sıcaklığa sahip durumların farklı inkübatörlere girme ihtiyacı bulunmaktadır. Bu çalışmanın deney tasarımında her bir kuyucuk bir kombinasyonu temsil edecek şekilde planlanmış ve uygulanmıştır. Üç farklı inkübasyon sıcaklığı uygulandığı için, plakalar üreme durumları açısından 9 gün süreyle takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8 - Tablo 4.24 arasında 9 süreyle takip edilmiş plakalara ait sonuçlar verilmiştir. Tablolarda üremenin varlığı ve yokluğu, 1 ve 0 olarak ifade edilmiştir.

4.7 Ekstrakt Konsantrasyonu, İnokulum Miktarı, Sıcaklık, pH ve a_w'nin *Listeria monocytogenes*'in Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi İle İlgili Sonuçlar

L. monocytogenes'in biyofilm oluşumu üzerine ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin etkisi sadece bir önceki aşamada bakteri üremesinin gözlemlendiği kombinasyonlardan inkübasyon sıcaklığı 35°C olan kombinasyonlar test edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29 ve 4.30'da verilmiştir.

4.8 İstatistiksel Analiz Sonuçları

4.8.1 MİK ve MBK Verileri İle İlgili İstatistiksel Analiz

MİK ve MBK testleri için tüm denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Bütün tekrarlı çalışmalarda elde edilen sonuçlar aynı olduğu için herhangi bir istatistiksel analiz yapmaya gerek kalmadan MİK ve MBK'da yapılan tekrarlı çalışmalar arasında farkın olmadığını söylemek mümkündür.

Tablo 4.8 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	A1	1	0,5	5	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	2	1,5	5	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	3	2,5	5	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	A4	10	0,5	5	5,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A5	11	1,5	5	5,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A6	12	2,5	5	5,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
I	A7	19	0.5	5	6,0	0.997	MİK/8	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	A8	20	1.5	5	6,0	0.997	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	A9	21	2.5	5	6,0	0.997	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
I	A10	28	0.5	5	4,0	0,943	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	A11	29	1.5	5	4,0	0,943	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	A12	30	2.5	5	4,0	0,943	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
I	B1	37	0.5	5	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B2	38	1.5	5	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B3	39	2.5	5	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.9 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	B4	46	0,5	5	6,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B5	47	1,5	5	6,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B6	48	2,5	5	6,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
I	B7	55	0,5	5	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B8	56	1,5	5	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B9	57	2,5	5	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	B10	64	0,5	5	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B11	65	1,5	5	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B12	66	2,5	5	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	C1	73	0,5	5	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C2	74	1,5	5	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C3	75	2,5	5	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	C4	82	0,5	5	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C5	83	1,5	5	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C6	84	2,5	5	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.10 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	C7	91	0,5	5	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C8	92	1,5	5	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C9	93	2,5	5	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
I	C10	100	0,5	5	6,0	0,997	MİK/4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	C11	101	1,5	5	6,0	0,997	MİK/4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	C12	102	2,5	5	6,0	0,997	MİK/4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
I	D1	109	0,5	5	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D2	110	1,5	5	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D3	111	2,5	5	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	D4	118	0,5	5	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D5	119	1,5	5	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D6	120	2,5	5	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	D7	127	0,5	5	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D8	128	1,5	5	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D9	129	2,5	5	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.11 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	D10	136	0,5	5	4,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D11	137	1,5	5	4,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D12	138	2,5	5	4,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	E1	145	0,5	5	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E2	146	1,5	5	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E3	147	2,5	5	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	E4	154	0,5	5	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E5	155	1,5	5	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E6	156	2,5	5	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	E7	163	0,5	5	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E8	164	1,5	5	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E9	165	2,5	5	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	E10	172	0,5	5	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E11	173	1,5	5	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E12	174	2,5	5	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.12 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	F1	181	0,5	5	6,0	0,997	MİK/2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	F2	182	1,5	5	6,0	0,997	MİK/2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	F3	183	2,5	5	6,0	0,997	MİK/2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
I	F4	190	0,5	5	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F5	191	1,5	5	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F6	192	2,5	5	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	F7	199	0,5	5	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F8	200	1,5	5	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F9	201	2,5	5	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	F10	208	0,5	5	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F11	209	1,5	5	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F12	210	2,5	5	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	G1	217	0,5	5	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2	218	1,5	5	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3	219	2,5	5	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.13 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	G4	226	0,5	5	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G5	227	1,5	5	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G6	228	2,5	5	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	G7	235	0,5	5	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G8	236	1,5	5	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G9	237	2,5	5	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	A1	4	0,5	20	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	5	1,5	20	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	6	2,5	20	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	A4	13	0,5	20	5,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A5	14	1,5	20	5,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A6	15	2,5	20	5,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
II	A7	22	0,5	20	6,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	A8	23	1,5	20	6,0	0,997	MİK/8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A9	24	2,5	20	6,0	0,997	MİK/8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tablo 4.14 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
II	A10	31	0,5	20	4,0	0,943	MİK/8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A11	32	1,5	20	4,0	0,943	MİK/8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A12	33	2,5	20	4,0	0,943	MİK/8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
II	B1	40	0,5	20	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B2	41	1,5	20	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B3	42	2,5	20	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	B4	49	0,5	20	6,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B5	50	1,5	20	6,0	0,943	MİK/8	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	B6	51	2,5	20	6,0	0,943	MİK/8	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
II	B7	58	0,5	20	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B8	59	1,5	20	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B9	60	2,5	20	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	B10	67	0,5	20	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B11	68	1,5	20	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B12	69	2,5	20	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.15 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
II	C1	76	0,5	20	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C2	77	1,5	20	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C3	78	2,5	20	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	C4	85	0,5	20	4,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C5	86	1,5	20	4,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C6	87	2,5	20	4,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	C7	94	0,5	20	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C8	95	1,5	20	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C9	96	2,5	20	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
II	C10	103	0,5	20	6,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	C11	104	1,5	20	6,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	C12	105	2,5	20	6,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
II	D1	112	0,5	20	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D2	113	1,5	20	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D3	114	2,5	20	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.16 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
II	D4	121	0,5	20	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D5	122	1,5	20	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D6	123	2,5	20	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	D7	130	0,5	20	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D8	131	1,5	20	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D9	132	2,5	20	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	D10	139	0,5	20	4,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D11	140	1,5	20	4,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D12	141	2,5	20	4,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	E1	148	0,5	20	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E2	149	1,5	20	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E3	150	2,5	20	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	E4	157	0,5	20	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E5	158	1,5	20	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E6	159	2,5	20	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.17 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
II	E7	166	0,5	20	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E8	167	1,5	20	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E9	168	2,5	20	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	E10	175	0,5	20	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E11	176	1,5	20	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E12	177	2,5	20	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	F1	184	0,5	20	6,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	F2	185	1,5	20	6,0	0,997	MİK/2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F3	186	2,5	20	6,0	0,997	MİK/2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
II	F4	193	0,5	20	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F5	194	1,5	20	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F6	195	2,5	20	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	F7	202	0,5	20	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F8	203	1,5	20	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F9	204	2,5	20	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.18 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
II	F10	211	0,5	20	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F11	212	1,5	20	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F12	213	2,5	20	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	G1	220	0,5	20	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2	221	1,5	20	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3	222	2,5	20	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	G4	229	0,5	20	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G5	230	1,5	20	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G6	231	2,5	20	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	G7	238	0,5	20	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G8	239	1,5	20	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G9	240	2,5	20	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	A1	7	0,5	35	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	8	1,5	35	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	9	2,5	35	4,0	0,997	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.19 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
III	A4	16	0,5	35	5,0	0,997	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	A5	17	1,5	35	5,0	0,997	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	A6	18	2,5	35	5,0	0,997	MİK/8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
III	A7	25	0,5	35	6,0	0,997	MİK/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A8	26	1,5	35	6,0	0,997	MİK/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A9	27	2,5	35	6,0	0,997	MİK/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
III	A10	34	0,5	35	4,0	0,943	MİK/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A11	35	1,5	35	4,0	0,943	MİK/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A12	36	2,5	35	4,0	0,943	MİK/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
III	B1	43	0,5	35	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B2	44	1,5	35	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B3	45	2,5	35	5,0	0,943	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	B4	52	0,5	35	6,0	0,943	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	B5	53	1,5	35	6,0	0,943	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	B6	54	2,5	35	6,0	0,943	MİK/8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Tablo 4.20 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
III	B7	61	0,5	35	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B8	62	1,5	35	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B9	63	2,5	35	4,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	B10	70	0,5	35	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B11	71	1,5	35	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B12	72	2,5	35	5,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	C1	79	0,5	35	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C2	80	1,5	35	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C3	81	2,5	35	6,0	0,888	MİK/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	C4	88	0,5	35	4,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C5	89	1,5	35	4,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C6	90	2,5	35	4,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	C7	97	0,5	35	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	C8	98	1,5	35	5,0	0,997	MİK/4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	C9	99	2,5	35	5,0	0,997	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Tablo 4.21 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
III	C10	106	0,5	35	6,0	0,997	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	C11	107	1,5	35	6,0	0,997	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	C12	108	2,5	35	6,0	0,997	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
III	D1	115	0,5	35	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D2	116	1,5	35	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D3	117	2,5	35	4,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	D4	124	0,5	35	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D5	125	1,5	35	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D6	126	2,5	35	5,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	D7	133	0,5	35	6,0	0,943	MİK/4	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	D8	134	1,5	35	6,0	0,943	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	D9	135	2,5	35	6,0	0,943	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
III	D10	142	0,5	35	4,0	0,888	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	D11	143	1,5	35	4,0	0,888	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	D12	144	2,5	35	4,0	0,888	MİK/4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Tablo 4.22 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
III	E1	151	0,5	35	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E2	152	1,5	35	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E3	153	2,5	35	5,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	E4	160	0,5	35	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E5	161	1,5	35	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E6	162	2,5	35	6,0	0,888	MİK/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	E7	169	0,5	35	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E8	170	1,5	35	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E9	171	2,5	35	4,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	E10	178	0,5	35	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E11	179	1,5	35	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E12	180	2,5	35	5,0	0,997	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	F1	187	0,5	35	6,0	0,997	MİK/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F2	188	1,5	35	6,0	0,997	MİK/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F3	189	2,5	35	6,0	0,997	MİK/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tablo 4.23 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
III	F4	196	0,5	35	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F5	197	1,5	35	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F6	198	2,5	35	4,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	F7	205	0,5	35	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F8	206	1,5	35	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F9	207	2,5	35	5,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	F10	214	0,5	35	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F11	215	1,5	35	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F12	216	2,5	35	6,0	0,943	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	G1	223	0,5	35	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2	224	1,5	35	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3	225	2,5	35	4,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	G4	232	0,5	35	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G5	233	1,5	35	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G6	234	2,5	35	5,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.24 Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar

Plaka No	Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Gün									Sonuç
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	
III	G7	241	0,5	35	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G8	242	1,5	35	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G9	243	2,5	35	6,0	0,888	MİK/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4.25 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar

Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Absorbans
A1	7	0,5	35	4,0	0,997	MİK/8	0,00000
A2	8	1,5	35	4,0	0,997	MİK/8	0,00000
A3	9	2,5	35	4,0	0,997	MİK/8	0,00000
A4	16	0,5	35	5,0	0,997	MİK/8	0,04633
A5	17	1,5	35	5,0	0,997	MİK/8	0,03833
A6	18	2,5	35	5,0	0,997	MİK/8	0,02700
A7	25	0,5	35	6,0	0,997	MİK/8	0,04167
A8	26	1,5	35	6,0	0,997	MİK/8	0,03800
A9	27	2,5	35	6,0	0,997	MİK/8	0,03267
A10	34	0,5	35	4,0	0,943	MİK/8	0,00000
A11	35	1,5	35	4,0	0,943	MİK/8	0,00000
A12	36	2,5	35	4,0	0,943	MİK/8	0,00000
B1	43	0,5	35	5,0	0,943	MİK/8	0,00000
B2	44	1,5	35	5,0	0,943	MİK/8	0,00000
B3	45	2,5	35	5,0	0,943	MİK/8	0,00000

Tablo 4.26 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar

Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Absorbans
B4	52	0,5	35	6,0	0,943	MİK/8	0,02800
B5	53	1,5	35	6,0	0,943	MİK/8	0,02767
B6	54	2,5	35	6,0	0,943	MİK/8	0,02600
B7	61	0,5	35	4,0	0,888	MİK/8	0,00000
B8	62	1,5	35	4,0	0,888	MİK/8	0,00000
B9	63	2,5	35	4,0	0,888	MİK/8	0,00000
B10	70	0,5	35	5,0	0,888	MİK/8	0,00000
B11	71	1,5	35	5,0	0,888	MİK/8	0,00000
B12	72	2,5	35	5,0	0,888	MİK/8	0,00000
C1	79	0,5	35	6,0	0,888	MİK/8	0,00000
C2	80	1,5	35	6,0	0,888	MİK/8	0,00000
C3	81	2,5	35	6,0	0,888	MİK/8	0,00000
C4	88	0,5	35	4,0	0,997	MİK/4	0,00000
C5	89	1,5	35	4,0	0,997	MİK/4	0,00000
C6	90	2,5	35	4,0	0,997	MİK/4	0,00000

Tablo 4.27 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar

Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Absorbans
C7	97	0,5	35	5,0	0,997	MİK/4	0,03567
C8	98	1,5	35	5,0	0,997	MİK/4	0,04400
C9	99	2,5	35	5,0	0,997	MİK/4	0,04733
C10	106	0,5	35	6,0	0,997	MİK/4	0,04767
C11	107	1,5	35	6,0	0,997	MİK/4	0,03400
C12	108	2,5	35	6,0	0,997	MİK/4	0,03033
D1	115	0,5	35	4,0	0,943	MİK/4	0,00000
D2	116	1,5	35	4,0	0,943	MİK/4	0,00000
D3	117	2,5	35	4,0	0,943	MİK/4	0,00000
D4	124	0,5	35	5,0	0,943	MİK/4	0,00000
D5	125	1,5	35	5,0	0,943	MİK/4	0,00000
D6	126	2,5	35	5,0	0,943	MİK/4	0,00000
D7	133	0,5	35	6,0	0,943	MİK/4	0,02600
D8	134	1,5	35	6,0	0,943	MİK/4	0,02367
D9	135	2,5	35	6,0	0,943	MİK/4	0,02467

Tablo 4.28 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar

Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Absorbans
D10	142	0,5	35	4,0	0,888	MİK/4	0,00000
D11	143	1,5	35	4,0	0,888	MİK/4	0,00000
D12	144	2,5	35	4,0	0,888	MİK/4	0,00000
E1	151	0,5	35	5,0	0,888	MİK/4	0,00000
E2	152	1,5	35	5,0	0,888	MİK/4	0,00000
E3	153	2,5	35	5,0	0,888	MİK/4	0,00000
E4	160	0,5	35	6,0	0,888	MİK/4	0,00000
E5	161	1,5	35	6,0	0,888	MİK/4	0,00000
E6	162	2,5	35	6,0	0,888	MİK/4	0,00000
E7	169	0,5	35	4,0	0,997	MİK/2	0,00000
E8	170	1,5	35	4,0	0,997	MİK/2	0,00000
E9	171	2,5	35	4,0	0,997	MİK/2	0,00000
E10	178	0,5	35	5,0	0,997	MİK/2	0,00000
E11	179	1,5	35	5,0	0,997	MİK/2	0,00000
E12	180	2,5	35	5,0	0,997	MİK/2	0,00000

Tablo 4.29 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar

Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Absorbans
F1	187	0,5	35	6,0	0,997	MİK/2	0,03233
F2	188	1,5	35	6,0	0,997	MİK/2	0,02833
F3	189	2,5	35	6,0	0,997	MİK/2	0,03067
F4	196	0,5	35	4,0	0,943	MİK/2	0,00000
F5	197	1,5	35	4,0	0,943	MİK/2	0,00000
F6	198	2,5	35	4,0	0,943	MİK/2	0,00000
F7	205	0,5	35	5,0	0,943	MİK/2	0,00000
F8	206	1,5	35	5,0	0,943	MİK/2	0,00000
F9	207	2,5	35	5,0	0,943	MİK/2	0,00000
F10	214	0,5	35	6,0	0,943	MİK/2	0,00000
F11	215	1,5	35	6,0	0,943	MİK/2	0,00000
F12	216	2,5	35	6,0	0,943	MİK/2	0,00000
G1	223	0,5	35	4,0	0,888	MİK/2	0,00000
G2	224	1,5	35	4,0	0,888	MİK/2	0,00000
G3	225	2,5	35	4,0	0,888	MİK/2	0,00000

Tablo 4.30 *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etki eden faktörler ile ilgili sonuçlar

Kuyucuk	Deneme No	İnokulum Miktarı	Sıcaklık	pH	a_w	Ekstrakt Konsantrasyonu	Absorbans
G4	232	0,5	35	5,0	0,888	0,500	0,00000
G5	233	1,5	35	5,0	0,888	0,500	0,00000
G6	234	2,5	35	5,0	0,888	0,500	0,00000
G7	241	0,5	35	6,0	0,888	0,500	0,00000
G8	242	1,5	35	6,0	0,888	0,500	0,00000
G9	243	2,5	35	6,0	0,888	0,500	0,00000

4.8.2 Biyofilm Oluşum ve Ölçme Parametrelerinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar İle İlgili İstatistiksel Analiz

Biyofilm oluşum ve ölçme parametrelerinin belirlenmesine ait sonuçlar ile ilgili tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) detayı EK-A'da verilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre tabanı düz mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri 0,3718; U-tabanlı mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri 0,2897; tabanı düz mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri 0,9832 ve U-tabanlı mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri ise 0,9794 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakılarak yapılan tekrarlı çalışmaların sonuçları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığını söylemek mümkündür.

4.8.3 Antibiyofilm Aktivite Sonuçlarına Ait Sonuçlar İle İlgili İstatistiksel Analiz

Antibiyofilm aktivite sonuçlarına ait sonuçlar ile ilgili tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) detayı EK-A'da verilmiştir. *P. hartigii* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesine ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri 0,9815; *P. hartigii* aseton ekstraktının antibiyofilm aktivitesine ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri 0,9589 ve *F. pinicola* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesine ait sonuçların karşılaştırılmasına ait *p* değeri ise 0,137 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakılarak yapılan tekrarlı çalışmaların sonuçları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığını söylemek mümkündür.

4.8.4 *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etki Eden Parametreler İle İlgili İstatistiksel Analiz

Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerindeki etkilerinin analiz edilmesi için ikili (binary) lojistik regresyon analiz testi yapılmıştır.

Bu testte elde edilen sonuçlar Tablo 4.31'te verilmiştir.

Tablo 4.31 İkili (binary) lojistik regresyon analiz testi sonuçları

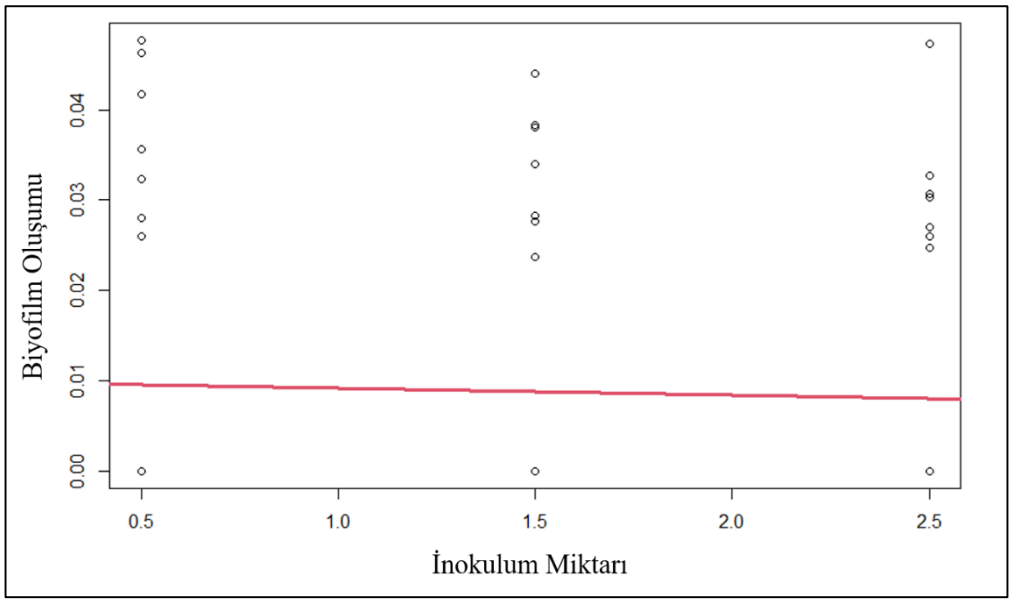
	Tahmin	Std. Hata	z Değeri	Pr(>|z|)
Sabit Katsayı	-39,99022	6,09767	-6,558	5,44e-11 ***
İnokulum miktarı	0,33454	0,23882	1,401	0,16127
Sıcaklık	0,04443	0,01641	2,707	0,00679 **
pH	1,31018	0,27206	4,816	1,47e-06 ***
a_w	33,71825	5,61515	6,005	1,91e-09 ***
Ekstrakt konsantrasyonu	-6,01923	1,45095	-4,148	3,35e-05 ***

Anlamlılık kodları: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 ',' 0,1 ' ' 1

4.8.5 *L. monocytogenes*'in Biyofilm Üretmesi Üzerine Etki Eden Parametreler İle İlgili İstatistiksel Analiz

Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerindeki etkileri tek tek denenmiştir.

İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım (scatter) grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği

İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu arasında bir korelasyonun bulunup bulunmadığını göstermek için pearson korelasyon testi yapılmış ve korelasyon

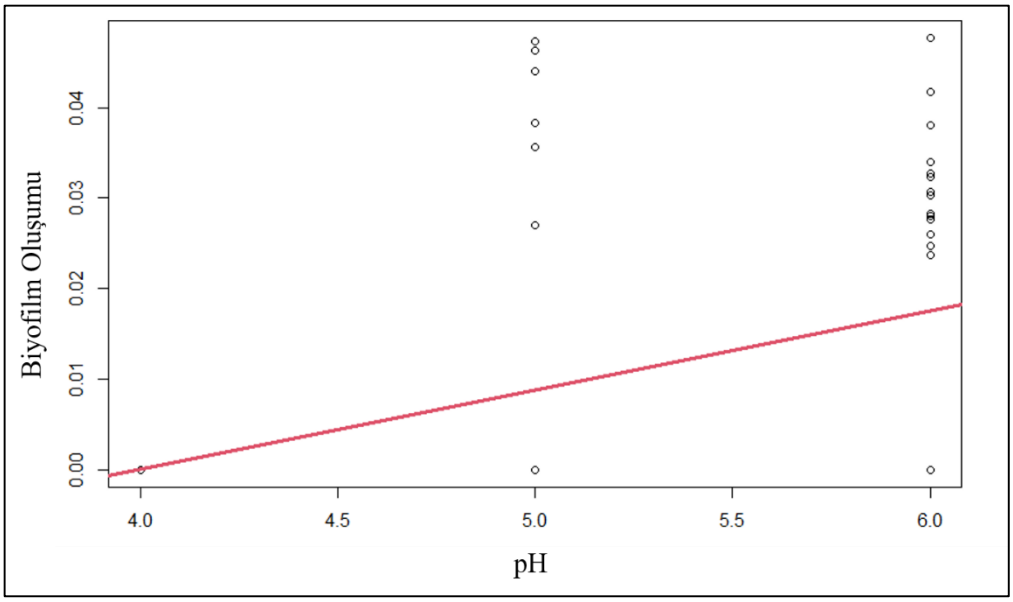
katsayısı -0,0384837 olarak bulunmuştur. Her ne kadar pearson korelasyon katsayısı inokulum miktarı ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki olmadığını gösterse de, lineer regresyon analizi yapılmıştır. İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu için yapılmış lineer regresyon analiz sonuçları Tablo 4.32'de verilmiştir.

Tablo 4.32 İnokulum miktarı ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(>|t|)
Sabit Katsayı	0,0098530	0,0036033	2,734	0,00771 **
İnokulum miktarı	-0,0007222	0,0021099	-0,342	0,73303

Anlamlılık kodları: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 ',' 0,1 ' ' 1

pH ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım (scatter) grafiği Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12 pH ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği

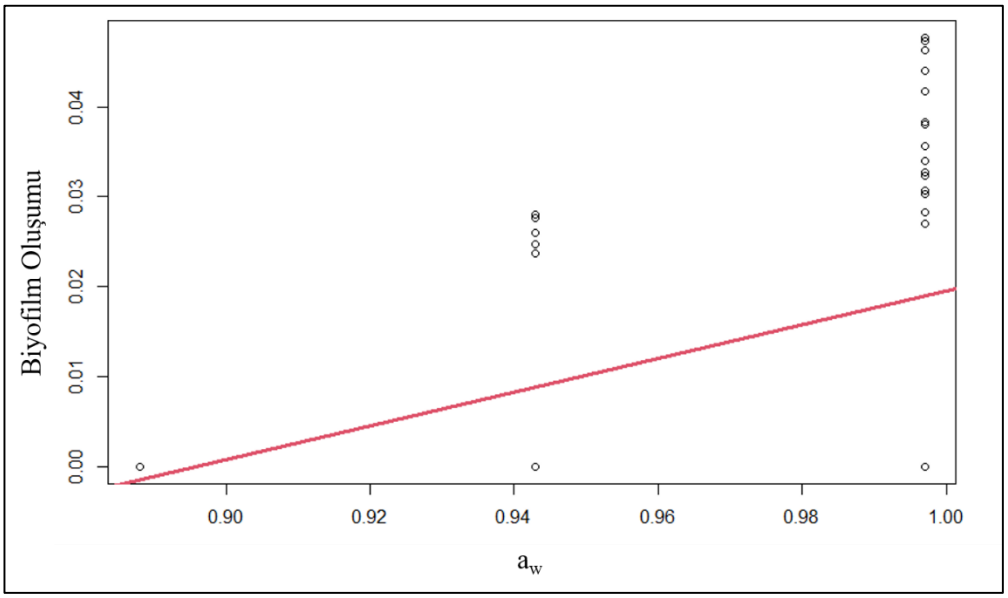
pH ile biyofilm oluşumu arasında bir korelasyonun bulunup bulunmadığını göstermek için pearson korelasyon testi yapılmış ve korelasyon katsayısı 0,4654356 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre pH ile biyofilm oluşumu arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmaktadır. pH ile biyofilm oluşumu için yapılmış lineer regresyon analiz sonuçları Tablo 4.33'te verilmiştir.

Tablo 4.33 pH ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(>|t|)
Sabit Katsayı	-0,034904	0,009468	-3,687	0,000415 ***
pH	0,008735	0,001869	4,674	1,2e-05 ***

Anlamlılık kodları: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 ',' 0,1 ' ' 1

a_w ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım (scatter) grafiği Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13 a_w ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği

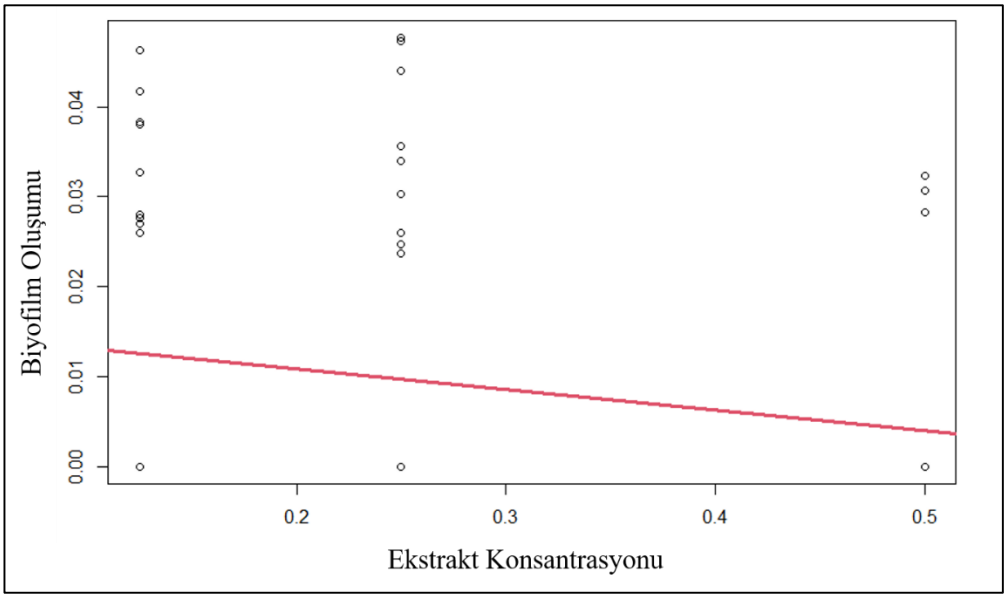
a_w ile biyofilm oluşumu arasında bir korelasyonun bulunup bulunmadığını göstermek için pearson korelasyon testi yapılmış ve korelasyon katsayısı 0,5462526 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre a_w ile biyofilm oluşumu arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmaktadır. a_w ile biyofilm oluşumu için yapılmış lineer regresyon analiz sonuçları Tablo 4.34'te verilmiştir.

Tablo 4.34 a_w ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(>|t|)
Sabit Katsayı	-0,16854	0,03062	-5,504	4,46e-07 ***
a_w	0,18810	0,03245	5,796	1,33e-07 ***

Anlamlılık kodları: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 ',' 0,1 ' ' 1

Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım (scatter) grafiği Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14 Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren saçılım grafiği

Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu arasında bir korelasyonun bulunup bulunmadığını göstermek için pearson korelasyon testi yapılmış ve korelasyon katsayısı -0.2324197 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu arasında zayıf düzeyde negatif bir ilişki bulunmaktadır. Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu için yapılmış lineer regresyon analiz sonuçları Tablo 4.35'de verilmiştir.

Tablo 4.35 Ekstrakt konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu lineer regresyon analiz sonuçları

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(>|t|)
Sabit Katsayı	0,015432	0,003557	4,339	4,2e-05 ***
Ekstrakt konsantrasyonu	-0,022844	0,010755	-2,124	0,0368 *

Anlamlılık kodları: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 ',' 0,1 ' ' 1

Ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, pH ve a_w'nin *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerindeki beraber etkilerinin analiz edilmesi için çoklu lineer regresyon analiz testi yapılmıştır.

Bu testte elde edilen sonuçlar Tablo 4.36'da verilmiştir.

Tablo 4.36 Çoklu lineer regresyon analiz testi sonuçları

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(>|t|)
Sabit Katsayı	-0,2044724	0,0256053	-7,986	1,17e-11 ***
İnokulum miktarı	-0,0007222	0,0014108	-0,512	0,61018
pH	0,0087348	0,0014108	6,192	2,80e-08 ***
a_w	0,1880984	0,0258854	7,267	2,75e-10 ***
Ekstrakt konsantrasyonu	-0,0228438	0,0073886	-3,092	0,00278 **

Anlamlılık kodları: 0 ‘***’ 0,001 ‘**’ 0,01 ‘*’ 0,05 ‘,’ 0,1 ‘ ‘ 1

5. TARTIŞMA

5.1 Ekstraksiyon verimi

Tablo 4.2'de, kullanılan dört farklı çözücünün üç makrofungus için ekstraksiyon verimleri verilmiştir. Buna göre EtOH hem *F. fomentarius*, hem de *P. hartigii* için en yüksek miktarda ekstraksiyonu sağlayan çözücü olmuştur. *F. pinicola* için ise EtOH, kloroformdan sonra ikinci en yüksek ekstraksiyon sağlayan çözücüdür.

F. fomentarius için ekstraksiyon verimlerine açısından çözücüler sıralandığında EtOH (%3,61), kloroform (%1,60), EtOAc (%1,32) ve aseton (%0,57) iken; bu sıralama *P. hartigii* için EtOH (%2,21), kloroform (%1,69), aseton (%1,40) ve EtOAc (%0,18); *F. pinicola* için ise kloroform (%28,26), EtOH (%25,27), EtOAc (%19,94) ve aseton (%4,01) şeklinde olduğu görülmüştür.

Ekstraksiyon verimleri arasında özellikle *F. pinicola*'nın (%28,26), EtOH (%25,27) ve EtOAc (%19,94) ekstraktları, ekstraksiyon yüzdeleri açısından oldukça dikkat çekicidir. Ekstraksiyon yüzdeleri diğer ekstraksiyonlara göre çok yüksek olsa da literatürde bu mantar için nispeten yüksek ekstraksiyon yüzdeleri bildirilmiştir. Örneğin, Onar (2015) *F. pinicola*'dan EtOH (%99'luk), EtOH (%70'lik) ve su ile sırasıyla %12,70; %11,27 ve %6,72 ekstrakt elde etmiştir. Bu değerler her ne kadar bu tez çalışmasında elde edilmiş değerlerden düşük olsa da, her iki çalışmada kullanılan ekstraksiyon yöntemleri farklı olduğu için ekstraksiyon verimlerinin farklı olması normal kabul edilebilir.

Literatürde diğer mantarların ekstraksiyon verimleri ile ilgili bir çalışma bulunamadığı için karşılaştırılamamıştır.

5.2 MİK ve MBK Testleri

MİK ve MBK değerleri analiz edilirken dikkat edilmesi gereken nokta, MİK ve MBK değerinin küçük olduğu durumların daha yüksek antibakteriyel etki göstermiş olmasıdır.

Tablo 4.4 incelendiğinde MİK açısından en yüksek aktivitenin *P. hartigii*'nin EtOAc ekstraktı tarafından gösterildiğini (MİK = 70 µg/mL) söylemek mümkündür. MİK değerine göre en düşük antibakteriyel aktivite ise *F. pinicola*'nın kloroform ekstraktı tarafından gösterilmiştir (MİK = 4,4 mg/mL).

Keepers vd. (2014) MBK/MİK oranının 4'e eşit ve 4'den büyük olduğu durumda ekstraktın bakteriostatik etki gösterdiğini, bu oranın 4'den küçük olduğu durumda ise ekstraktın bakterisidal olduğunu kabul etmektedir.

Buna göre bütün ekstraktlar için MBK/MİK oranı Tablo5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1 MBK/MİK oranları

	Mantarlar		
Ekstraktlar	*F. fomentarius*	*P. hartigii*	*F. pinicola*
Aseton	?	1	8
Etil Alkol	?	>8	126
Kloroform	?	1	4
Etil Asetat	?	?	4

? : Yorum yapılamaz.

Tablo 5.1 incelendiğinde 4 farklı durum göze çarpmaktadır.

Bunlardan birincisi MBK/MİK değerinin 4'den küçük olduğu durumlardır. Bu duruma uyan iki adet ekstrakt bulunmaktadır. *P. hartigii*'nin aseton ve kloroform ekstraktları için MBK/MİK değeri 1'e eşittir. Bu durum. *P. hartigii*'nin aseton ve kloroform ekstraktlarının sırasıyla 559,6 µg/mL ve 677,6 µg/mL konsantrasyonlarının *L. monocytogenes* bakterisine karşı bakterisidal bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

İkinci durum, MBK/MİK değerinin ≥ 4 olduğu durumdur. Bu duruma uyan 4 ekstrakt bulunmaktadır. *F. pinicola*'nın bütün ekstraktları için MBK/MİK değeri ≥ 4'tür. Bu durum, *F. pinicola*'nın aseton, EtOH, kloroform ve EtOAc ekstraktlarının sırasıyla 310 µg/mL, 2 mg/mL, 4,4 mg/mL ve 1,5578 mg/mL konsantrasyonlarının *L. monocytogenes* bakterisine karşı bakteriyostatik bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Üçüncü durum *P. hartigii*'nin EtOH ekstraktında görülmektedir. Bu ekstrakt için denenen en yüksek konsantrasyonda bile MBK testinde üreme olduğu için kesin bir MBK değeri bulunamamıştır. Ancak, daha yüksek bir konsantrasyon denenmiş olsaydı ve bu konsantrasyon için MBK testinde üreme olmasaydı bile MBK/MİK oranının 8'den büyük olacağı açıktır. Bu sebeple, *P. hartigii*'nin EtOH ekstraktının 110,4 µg/mL konsantrasyonunun *L. monocytogenes* bakterisine karşı bakteriyostatik bir etki gösterdiğini söylemek mümkündür.

Tablo 5.1'ten çıkartılabilecek son durum ise MBK/MİK değerinin ≥ 4 olup olmadığını mevcut verilerle söyleyemeyeceğimiz durumdur. Bu durum *F. fomentarius*'un bütün ekstraktları ve *P. hartigii*'nin EtOAc ekstraktı için geçerlidir. *F. fomentarius*'un bütün ekstraktları ve *P. hartigii*'nin EtOAc ekstraktı için denenen bütün konsantrasyonların bakteriostatik veya bakteriosital olduğunu söylemek mümkün değildir.

Mevcut literatürde, *P. hartigii* ve *F. pinicola*'nın *L. monocytogenes* üzerindeki antibakteriyel aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

P. hartigii'nin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili tek çalışma Altuner ve Akata (2010) tarafından yapılmıştır. Ancak bu çalışmada, bir çözücü kokteyli (dH_2O : etil alkol : metil alkol : aseton : CH_2Cl_2 (1:2,5:2,5:2:2) kullanılarak elde edilen *P. hartigii* ekstraktının disk difüzyon yöntemiyle *C. albicans* ATCC 26555, *E. coli* ETEC LM 63083, *P. aeruginosa* (klinik izole), *S. enterica* serotype Typhimurium SL 1344 ve *S. flexneri* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Çalışma sonunda, *P. hartigii*'nin sadece *S. flexneri*'ye karşı aktif olduğunu gözlenmiştir. Ancak hem kullanılan yöntem, hem de antimikrobiyal etkinin denendiği mikroorganizmalar bu tez çalışması ile aynı olmadığı için verilerin karşılaştırılması mümkün değildir.

Ayrıca, Dresch vd. (2015), *F. fometarius* ve *F. pinicola* etanol ekstraktlarının *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *B. subtilis* MB37'ye karşı antibakteriyel aktivitelerini MİK testi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak *F. fometarius* etanol ekstraktının 250 ile 500 µg/mL MİK değerleri ile sadece *S. aureus*'a karşı aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Diğer yandan, *F. pinicola* sırasıyla 31-125 µg/mL ve 31-500 µg/mL MİK değerleri ile *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı,

antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu çalışmadaki veriler MİK testinden elde edilen veriler olmasına rağmen antibakteriyel etkinin denendiği bakteri suşları bu tez çalışmasında kullanılan suştan farklı olduğu için verilerin karşılaştırılması mümkün değildir.

Pala vd. (2019) de *F. pinicola*'nın EtOAc, metanol ve su ekstraktlarının *B. subtilis, S. aureus, E. coli, P. vulgaris, K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesini agar kuyu difüzyon testi ile test etmişlerdir. Sonuç olarak, etil asetat ve metanol ekstraktlarının tüm suşlara karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini, ancak su ekstraktlarının test edilen suşların hiçbirinde aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen verilere göre *F. pinicola* EtOAc ekstraktının 1,5578 mg/mL konsantrasyonunda *L. monocytogenes* bakterisine karşı bakteriostatik bir etki gözlenmiştir. Ancak bu iki çalışmadaki veriler, *F. pinicola* EtOAc ekstraktının antibakteriyel etki gösterebileceğinden öte bir yorum yapılmasına imkân vermemektedir.

Kolundžić vd. (2016), *F. fometarius* sikloheksan, diklormetan, metanol ve sulu ekstraktlarının *S. aureus, S. epidermidis, M. luteus, B. subtilis, E. feacalis, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* ve *S. abony*'e karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek üzere MİK testi ile bir çalışma yapmışlardır. Tüm ekstraktların 9 bakteri suşuna karşı minimum inhibitör konsantrasyonlarının 125-250 µg/mL aralığında olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmadaki veriler MİK testinden elde edilen veriler olmasına rağmen antibakteriyel etkinin denendiği bakteri suşları bu tez çalışmasında kullanılan suştan farklı olduğu için verilerin karşılaştırılması mümkün değildir.

Orhan (2017), *F. fomentarius* ekstraktının *S. epidermis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 2392, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı antibakteriyel aktivitesini karşı disk difüzyon testi ile incelemişler. Sonuç olarak, *F. fomentarius* ekstraktının tüm bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bu çalışma *F. fomentarius*'un *L. monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı etkili olduğunu gösteren tek çalışma olmasına rağmen, kullanılan yöntemler farklı olduğu için bu iki çalışmanın sonuçlarını karşılaştırmak mümkün değildir.

5.3 Makrofungusların Antibiyofilm Aktiviteleri

Literatür tarandığında bu tez çalışmasında kullanılan makrofungusların sadece *L. monocytogenes* bakterisine karşı antibiyofilm aktivitesi ile ilgili değil, diğer hiçbir mikroorganizmanın biyofilm oluşumuna karşı etkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu sebeple bu tezden elde edilen bulguların herhangi bir veri ile karşılaştırılması mümkün değildir.

Ancak daha önceden de bahsedildiği gibi literatürde aynı aileye ait başka mantarlar için yapılmış antibiyofilm çalışmaları bulunmaktadır. Literatürde *Polyporaceae* ailesine ait Karaca vd. (2020) ve Yang vd. (2013) gibi az sayıda çalışma olsa da bunlar, bu tez çalışmasında mantar türleri ve bakteriden farklı olan çalışmalardır Bu sebeple bu sonuçlar sadece bu ailede antibiyofilm özelliği bulunan türler olduğunu göstermesi açısından kullanılabilir.

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 *P. hartigii* kloroform ve aseton ekstraktlarının doza bağlı olarak değişen düzeylerde *L. monocytogenes* biyofilm aktivatörü olarak görev aldığını gösterirken, çalışılan ekstraktlardan sadece *F. pinicola*'nın kloroform ekstraktının (Şekil 4.10) konsantrasyona bağlı olarak farklı seviyelerde inhibitör olarak etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

5.4 *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etki Eden Parametreler

Yapılan deneylerde ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w gibi parametrelerin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu etkinin ne şekilde olduğunun analiz edilmesi için ikili (binary) lojistik regresyon analiz testi yapılmıştır.

Bu testten elde edilmiş olan sonuçlar Tablo 4.31'de verilmiştir. Bu tablo incelendiğinde test edilen parametrelerin *L. monocytogenes* üremesi üzerine etkisini ortaya koyacak denkleme ait sabit katsayının (intercept) -39,99 olduğu ve bu katsayı için p = 5,44e-11 olduğu ve bu p değeri, p=0,05 düzeyinde değerlendirildiğinde anlamlı bulunduğu için denkleme dâhil edilmesi gerektiği görülmektedir.

Tablo 4.31 incelendiğinde inokulum miktarının üreme üzerinde etkisinin olmadığı (p=0,161), bu sebeple denkleme dâhil edilmemesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Aslında mikroorganizmaların belli bir zaman içinde üremesinde inokulum miktarının etkili olması beklenen bir sonuçtur, ancak yapılan bu tez çalışmasında inokulum miktarı için seçilen alt limit (0,5 McFarland) üremek için oldukça yeterli bir miktardır. Bu sebeple, alt limit az miktardaki mikroorganizmanın belirli bir süre sonunda üremede yaşanabilecek problemleri ortaya koyacak bir inokulum miktarı seçilmiş olsaydı, bu parametrenin gerçek etkisini gözlemlemek belki de mümkün olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan yapılan çalışmalar, 0,5 McFarland'ın çok altındaki *L. monocytogenes* seviyelerinin, yani tüketim sırasında gıdada gramı başına 10^2 ila 10^3 CFU'yu geçmeyen seviyelerin, çoğu tüketici için düşük bir risk oluşturduğunu göstermektedir (Centers for Disease Control and Prevention, 1999; Gilbert vd., 1996; Tienungoon vd., 2000). *L. monocytogenes*'in soğuk saklama koşullarında bile üremeye devam ettiği düşünüldüğünde, gramı başına 10^2 ila 10^3 CFU'yu geçmeyen seviyelerin risk olmayacağının belirtilmiş olması aslında oldukça düşük inokulum miktarının üremeyi etkileyebileceğinin kanıtı olarak düşünülebilir.

Almanya, Hollanda, Fransa ve Kanada gibi bazı ülkelerin ulusal düzenleyici makamları, gıda ürünlerinde raf ömrü boyunca *L. monocytogenes*'in kabul edilemez seviyelerde büyüyememesi koşuluyla, gıdalardaki düşük *L. monocytogenes* seviyelerine tolerans içeren bir gıda güvenliği risk yönetimi stratejisini desteklemiş veya benimsemiştir (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999; Tienungoon vd., 2000). Bu durum da düşük inokulum miktarının üremeyi etkileyebileceğini düşündürebilir.

Tablo 4.31'deki veriler sıcaklık parametresinin 0,04 katsayısı ile (p=0,00679), *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine bütün parametrelerin etkisini ortaya koyacak denkleme dâhil edilmesi gerektiğini göstermektedir.

L. monocytogenes 1 ila 45°C arasında olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında gelişme göstermektedir. Bu bakteri için optimum büyüme sıcaklığı yaklaşık 37°C'dir (Seeliger ve Jones, 1986; Azizoğlu vd., 2009). Hatta *L. monocytogenes*'in üreme aralığının biraz

daha geniş (-1,5 ila 45°C) olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. *L. monocytogenes*'in riskli olmasının sebebi, 0°C'ye kadar düşük sıcaklıklarda büyüyebildiği için, gıdaların soğutularak depolanması sırasında yavaş da olsa büyüme potansiyeline sahip olmasıdır (Lado ve Yousef, 2007; Kureljusic vd., 2019).

L. monocytogenes 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda laboratuvar ortamı besiyerinde (Walker vd., 1990; Bajard vd., 1996) ve vakumlanarak paketlenen gıdalarda da (Hudson ve Mott, 1993; Bell vd., 1995; Tienungoon vd., 2000) ürediği belirtilmiştir. Ancak, *L. monocytogenes* için minimum üreme sıcaklıkları, çeşitli besiyeri ortamlarında 0,5 ila 5,0°C arası (Wilkins vd., 1972; Juntilla vd., 1988; Duh ve Schaffner, 1993; Gill vd., 1997) ve gıdalarda 3 ila 4°C arası (Ross, 1993; Tienungoon, 1998; Membré vd., 1999; Tienungoon vd., 2000) olarak da belirtilmiştir.

Bütün bu çalışmalar da sıcaklığın *L. monocytogenes* üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.31'deki veriler pH parametresinin 1,31 katsayısı ile (p=1,47e-06), *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine bütün parametrelerin etkisini ortaya koyacak denkleme dâhil edilmesi gerektiğini göstermektedir.

L. monocytogenes oldukça geniş bir pH aralığında üreme ve hayatta kalma yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Nolan vd., 1992).

Benkerroum ve Sandine (1988)'in yaptığı çalışmada *L. monocytogenes*'in 5,5 ila 7,0 arasındaki pH'da iyi ürediği gösterilmiştir. pH 5,0 iken üremenin yavaş olduğu, ancak tamamen engellenmediği görülmüştür. pH'ın inhibisyon etkisi, pH değeri 4,5 ve altındayken net bir şekilde açığa çıkmıştır. Örneklerde pH 4,5 iken 48 saat sonra ve pH 3,5 olduğunda ise yalnızca 24 saat sonra patojen yok edilmiştir.

Conner vd. (1986), *L. monocytogenes*'in 4,6'dan düşük pH değerlerinde tamamen inhibe edildiğini, ancak pH 5,6 olduğu durumda iyi ürediği belirtmişlerdir.

Diğer taraftan Lovett vd. (1988), *L. monocytogenes*'in 4,5'ten düşük ve 9,4'ten yüksek pH seviyelerinde azalan canlılık sergilediğini belirtmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada *L. monocytogenes*'in üremesi için minimum pH değeri 4,3 olarak bildirilmiştir (George vd., 1988; Faber vd., 1992). *L. monocytogenes*'in Scott A ve L5 suşlarının 4,23 ve 4,25 gibi düşük pH değerlerinde bile büyüyebildiği bulunmuştur (Tienungoon, 1998; Tienungoon vd., 200).

Bu çalışmalar pH'ın *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisi olduğunu açıkça göstermektedir. Hatta yapılan bazı çalışmalar pH ve sıcaklığın beraber etkisini ortaya koymaktadır.

George ve Levett (1990), *L. monocytogenes*'in pH değeri 3,9 olan taze lahana salatasında hayatta kalması ve üremesini, inokülasyon öncesinde lahana salatasının pH değeri 4,0; 5,0; 6,0 veya 7,0'a ayarlayarak üç farklı sıcaklıkta (4°C, 15°C ve 25°C) incelemişlerdir. 5 günlük inkübasyon sonrasında, taze lahana salatasında veya pH değeri 4,0'a ayarlanan lahana salatasında *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir. Ayrıca, pH değeri 5,0 olan lahana salatasında, incelenen üç sıcaklıkta da *L. monocytogenes* inhibisyonu görülmüştür. pH değeri 6,0 olan lahana salatasında 4°C'de ve 15°C'de canlı *L. monocytogenes* sayısında düşüş meydana gelmiş, ancak, 25°C'de ise canlı *L. monocytogenes* sayısı başlangıçta artmış ve 25 günlük inkübasyon sonrasında yüksek kalmıştır. *L. monocytogenes*, incelenen üç sıcaklıkta da pH değeri 7,0 olan lahana salatasında hızla büyümüş, ardından, canlı sayısı aynı şekilde hızla düşmüştür.

George vd. (1988) 30°C, 20°C, 10°C, 7°C ve 4°C'de büyüme tespit edilen minimum pH değerlerinin sırasıyla 4,39; 4,39; 4,62; 4,62 ve 5,23 olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tablo 4.31'deki veriler a_w parametresinin 33,72 katsayısı ile (p=1,91e-09), *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine bütün parametrelerin etkisini ortaya koyacak denkleme dâhil edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Korunmuş, işlenmiş et ürünleri ve çeşitli peynirlerde görülen listeriyoz salgınları, bu organizmanın yüksek NaCl konsantrasyonlarında bile üreyebildiğini göstermiştir (Nolan vd., 1992). Seeliger (1961), *L. monocytogenesis*'in %10 (w/w) NaCl'de üreyebildiğini ve %16 (w/w) NaCl içeren bir çözeltide bir yıl hayatta kaldığını göstermiştir.

Papageorgiou ve Marth (1989), yağsız süt ve peynir altı suyunda iki NaCl konsantrasyonunun *L. monocytogenesis* üzerindeki etkisini değerlendirmiş ve %6 (w/w) NaCl'de (0,96 a_w) her iki ortamda da üremenin gerçekleştiğini ve %12 (w/w) NaCl'de (0,92 a_w 4°C) en az 132 gün boyunca hayatta kaldığının gözlendiğini kaydetmişlerdir.

Öte yandan makul derecede tuza toleranslı olan *L. monocytogenes*'in %13 - 14 sodyum klorürde üreyebildiği belirtilmiştir (Farber vd., 1992; Kureljusic vd., 2019).

Tuz varlığında hayatta kalma durumunun, saklama sıcaklığından etkilendiği açıkça gösterilmiştir. Çalışmalar, *L. monocytogenes*'in konsantre tuz çözeltilerinde hayatta kalma oranının, sıcaklığın düşmesiyle arttığını göstermiştir (Lado ve Yousef, 2007; Kureljusic vd., 2019).

Literatürde a_w ve sıcaklık parametrelerinin beraber gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır.

Shahamat vd. (1980) ise, a_w değeri NaCl ile çeşitli düzeylerde ayarlanan bakteriyolojik besiyerlerinde bu organizmanın hayatta kalmasını incelemiş ve %13 (w/w) NaCl'de (37°C) canlılığın 10 gün içinde kaybolduğunu bildirmiştir. Saf su kullanılarak elde edilmiş %13 (w/w) NaCl içeren bir çözeltinin a_w değeri 25°C'de yaklaşık 0,91'dir. %30,5 NaCl'ye kadar olan daha yüksek tuz konsantrasyonlarında ise 37°C'de hayatta kalma süreleri yaklaşık 5 güne düşmüş, ancak NaCl'nin etkisinin daha düşük sıcaklıklarda azaldığı görülmüştür.

McClure (1989), yaptığı çalışmada gradyan NaCl plakaları kullanmış ve 20°C'de %8,8 (w/w) NaCl (0,94 a_w) ile üremenin engellendiğini, ancak inkübasyon sıcaklığı 25°C'ye yükseltildiğinde ise üreme görülen minimum NaCl yüzdesinin %9,9 (w/w) olduğunu belirtmiştir. Sıcaklık daha da artırılıp 30°C ve 35°C'ye getirildiğinde ise üreme için tolere edilebilir minimum sodyum klorürün konsantrasyonu %9,9 (w/w)'un üzerine yükselmiştir. Bu sonuçlar laboratuvar ortamında elde edilmiş olup, tuzlu lahana suyu gibi doğal substratlardan elde edilen veriler (Conner vd., 1986), bu materyallerde hayatta kalma ve üreme için gereken minimum a_w seviyelerinin biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir.

L. monocytogenes'in üremesi için gerekli minimum a_w değerinin genellikle inkübasyon sıcaklığının düşmesiyle arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, *L. monocytogenes*'in, NaCl'yi en iyi şekilde 15°C'de ürerken tolere ettiği görülmüştür. *L. monocytogenes*, 0,93'ün altındaki a_w değerlerinde üreyebilen, gıda kaynaklı birkaç patojenden biridir (Farber vd., 1992).

Bu çalışmalardan da görüldüğü üzere a_w sadece tek başına değil, aynı zamanda sıcaklıkla beraber *L. monocytogenes*'in üremesine etki etmektedir.

Tablo 4.31'deki veriler son olarak ekstrakt konsantrasyonu parametresinin -6,02 katsayısı ile (p=3,35e-05), *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine bütün parametrelerin etkisini ortaya koyacak denkleme dâhil edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu veriler ışığında ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w gibi parametrelerin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine etkisini ortaya koyacak denklem aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$\text{Üreme tahmini} = \frac{e^{\{-39{,}99+0{,}04*Sıcaklık+1{,}31*pH+33{,}72*a_w-6{,}02*Ekstrakt\ konsantrasyonu\}}}{1+\ e^{\{-39{,}99+0{,}04*Sıcaklık+1{,}31*pH+33{,}72*a_w-6{,}02*Ekstrakt\ konsantrasyonu\}}} \quad (5.1)$$

Koutsoumanis ve Sofos (2005), dört farklı *L. monocytogenes* inokulum miktarı (0,90; 2,58; 4,20 ve 6,81 log cfu/kuyucuk) ile inoküle edilmiş tryptic soy broth (TSB) besiyerinde bakterinin üreme/ürememe tepkileri, farklı sıcaklık (4 ila 30°C arası), pH (3,76 ila 6,44 arası) ve a_w (0,888 ila 0,997 arası) kombinasyonlarında 60 gün boyunca izlemiştir. Çalışmada 96 kuyucuklu plakalar kullanılmış ve üreme görsel olarak ve besiyerindeki bulanıklığın bir mikroplaka okuyucu ile kaydedilmesiyle izlenmiştir. Patojenin üreme sınırlarının inokulum miktarından etkilendiği bulunmuştur. Bu gözlem, bu tez çalışmasında gözlenen sonuç ile çelişmektedir. Ancak bu çelişkinin muhtemel sebebi daha önce açıklanmıştır. Örneğin, 25°C ve a_w 0,997'de ve 4,45 ile 3,94 pH değerlerinde, üremenin sırasıyla 0,90 ve 6,81 log cfu/kuyucuk olduğu gözlenmiştir.

Benzer şekilde, 25°C ve pH 6,44'te üremenin gözlemlendiği minimum a_w değerleri inokulum miktarına bağlı olarak 0,900 ila 0,928 arasında değişmiştir.

Sonuçlar, 10 ila 30°C arasındaki sıcaklıklarda, test edilen inokulum seviyeleri arasında gözlenen üreme limitlerindeki farkın, tek bir faktörün (pH veya a_w) inhibe edici olduğu ortamlarda, pH ve aw'nin birlikte inhibe edici olduğu ortamlara kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir.

5.5 *L. monocytogenes*'in Biyofilm Üretmesi Üzerine Etki Eden Parametreler

Yapılan deneylerde ekstrakt konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, pH ve a_w gibi parametrelerin *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu etkinin ne şekilde olduğunun analiz edilmesi için çok değişkenli regresyon analiz testi yapılmıştır.

Bu testten elde edilmiş olan sonuçlar Tablo 4.36'da verilmiştir. Bu tablo incelendiğinde test edilen parametrelerin *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine etkisini ortaya koyacak denkleme ait sabit katsayının (intercept) -0,20 olduğu ve bu katsayı için *p*= 1,17e-11 olduğu ve bu *p* değeri, p=0,05 düzeyinde değerlendirildiğinde anlamlı bulunduğu için denkleme dâhil edilmesi gerektiği görülmektedir.

Tablo 4.36 incelendiğinde inokulum miktarının biyofilm üretme üzerinde etkisinin olmadığı (p=0,61), bu sebeple denkleme dâhil edilmemesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Aynı tablodaki veriler pH parametresinin 0,01 katsayısı ile (*p*=2,80e-08), a_w parametresinin 0,19 katsayısı ile (*p*=2,75e-10) ve ekstrakt konsantrasyonu parametresinin -0,02 katsayısı ile (*p*=0,002), *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine bütün parametrelerin etkisini ortaya koyacak denkleme dâhil edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bütün bu veriler ışığında *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerine bütün parametrelerin etkisini ortaya koyacak denklemin aşağıdaki gibi yazılması mümkündür.

$$Biyofilm\ miktarı$$
$$= -0{,}20 + 0{,}001 * \text{pH} + 0{,}19 * \text{aw} - 0{,}02$$
$$* \text{ Ekstrakt konsantrasyonu}$$

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışması sonucunda 3 ayrı makrofungustan, 4 farklı çözücü ile elde edilmiş 12 ekstraktın hepsinin *L. monocytogenes* üzerine farklı düzeylerde MİK değerleri gösterdiği görülmüştür. Ancak MİK testinin arkasından yapılan MBK testi bu 12 ekstrakttan sadece 2 adedinin (*P. hartigii* EtOH ve kloroform) MİK konsantrasyonunun bakteriyosidal etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bunun dışında 5 ekstrakt da (*F. pinicola* aseton, EtOH, kloroform, EtOAc ve *P. hartigii* EtOH) MİK konsantrasyonu için bakteriyostatik etki göstermiştir. Buna ek olarak *P. hartigii* kloroform ve aseton ekstraktlarının doza bağlı olarak değişen düzeylerde *L. monocytogenes* biyofilm aktivatörü olarak görev aldığı görülürken, çalışılan ekstraktlardan sadece *F. pinicola*'nın kloroform ekstraktının konsantrasyona bağlı olarak farklı seviyelerde inhibitör olarak etki gösterdiği ortaya konmuştur.

L. monocytogenes'in üremesi üzerine etki eden parametreler için yapılan ikili (binary) lojistik regresyon analizi ve *L. monocytogenes*'in biyofilm üretmesi üzerinde parametrelerin etkilerinin analiz edilmesi için yapılan çok değişkenli regresyon analiz testi sonucunda denenen parametrelerden sadece inokulum yoğunluğunun etkisiz olduğu, bunun dışındaki diğer parametrelerin tamamının hem üremede, hem de biyofilm oluşumunda etkili olduğu gözlenmiştir.

Ancak, deneylerde seçilmiş olan inokulum yoğunluğunun alt sınırı hali hazırda bakterinin üremesi için yeterli bir değer olduğundan dolayı, her iki test için de inokulum yoğunluğunun etkisiz olduğu sonucu gözlenmiştir. Bu sebeple bu konu ile ilgili yapılacak ileri çalışmalarda inokulum yoğunluğunun alt sınırının daha aşağı çekilmesinin sonuçları olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

ACS. (2021). *Ethyl acetate*, https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/e/ethyl-acetate.html, Erişim Tarihi: 12/01/2021.

Altuner, E. M. (2019). *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Test*. http://www.erginmurataltuner.com/index.php/2019/11/12/minimuminhibitory-concentration-mic-test/, Erişim Tarihi: 12/01/2021.

Altuner, E.M., & Akata I. (2010). Antimicrobial Activity of Some Macrofungi Extracts. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *14*(1), 45-49.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(suppl_1), 5-16.

Asker, D., Awad, T., Baker, P., Howell, L., & Hatton, B. (2016). Enzyme immobilization on biomaterial surfaces for prevention of pseudomonas aeruginosa biofilms. *10th World Biomaterials Congress*, 131, Montréal, Canada.

Augustin, J. C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., & Carlier, V. (2000). Significance of Inoculum Size in the Lag Time of Listeria monocytogenes. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(4), 1706-1710.

Azizoglu, R. O., Osborne, J., Wilson, S., & Kathariou, S. (2009). Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of Listeria spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(16), 5315-5320.

Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., & Flandrois, J. P. (1996). The particular behaviour of Listeria monocytogenes under sub-optimal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *29*(2-3), 201-211.

Bal, C., & Akgül, H. (2018). Pharmacological properties of Fomes fomentarius. *International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology*, 1195-1198, Ankara, Turkey.

Balandreau, J. (1986). Ecological factors and adaptive processes in N 2-fixing bacterial populations of the plant environment. F. A. Skinner & P. Uomala (Eds.), *Nitrogen Fixation with Non-Legumes* (pp. 73-92). Dordrecht: Springer.

Baranyi, J. (1998). Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology*, *192*(3), 403-408.

Baranyi, J., & Pin, C. (1999). Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(2), 732-736.

Batt, C. A. (2014). Listeria monocytogenes. C. A Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (p. 490). Poland: Elsevier.

Becattini, S., Littmann, E.R., Carter, R.A., Kim, S.G., Morjaria, S.M., Ling, L., Gyaltshen, Y., Fontana, E., Taur, Y., Leiner, I.M., & Pamer, E.G. (2017). Commensal microbes provide first line defense against Listeria monocytogenes infection. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(7), 1973-1989.

Bell, R. G., Penney, N., & Moorhead, S. M. (1995). Growth of the psychrotrophic pathogens Aeromonas hydrophila, Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica on smoked blue cod (Parapercis colias) packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*, *30*(4), 515-521.

Benkerroum, N., & Sandine, W. E. (1988). Inhibitory action of nisin against Listeria monocytogenes. *Journal of Dairy Science*, *71*(12), 3237-3245.

Binder, M., Justo, A., Riley, R., Salamov, A., Lopez-Giraldez, F., Sjökvist, E., Copeland, A., Foster, B., Sun, H., Larsson, E., & Larsson, K.H. (2013). Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia*, *105*(6), 1350-1373.

Bishop, K. S. (2020). Characterisation of Extracts and Anti-Cancer Activities of Fomitopsis pinicola. *Nutrients*, *12*(3), 609.

Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of Listeria monocytogenes as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, *59*(8), 827-831.

Bojsen-Moller, J. (1964). Occurrence of Listeria monocytogenes in feces from healthy and sick persons. *XIV Scandinavian Congress of Pathology and Microbiology*, Oslo, Norveç.

Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by Listeria monocytogenes in different materials and temperatures. *Food Control*, *35*(1), 386-391.

Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1986). *Fungi of Switzerland, Vol. 2. Non gilled fungi-Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gasteromycetes. Fungi of Switzerland, Vol. 2. Non gilled fungi-Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gasteromycetes*. Luzern: Verlag Mykologia.

Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 1-8.

CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). (1999). Update: multistate outbreak of listeriosis--United States, 1998-1999. MMWR. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *47*(51-52), 1117-1118.

Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., & Hebraud, M. (2002). Listeria monocytogenes LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(2), 728-737.

Cobb, C. A., Curtis, G. D., Bansi, D. S., Slade, E., Mehal, W., Mitchell, R. G., & Chapman, R. W. (1996). Increased prevalence of Listeria monocytogenes in the faeces of patients receiving long-term H2-antagonists. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *8*(11), 1071-1074.

Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). Listeria monocytogenes biofilms in the wonderland of food industry. Pathogens, *6*(3), 41.

Collins, M. D., Jonse, D., Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1979). Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of Listeria, Brochothrix, Erysipelothrix and Caryophanon. *Journal of General Microbiology*, *111*(2), 453-457.

Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., & Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus Listeria based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *41*(2), 240-246.

Conner, D. E., Brackett, R. E., & Beuchat, L. R. (1986). Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of Listeria monocytogenes in cabbage juice. *Applied and Environmental Microbiology*, *52*(1), 59-63.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, *12*(4), 564-582.

Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, *43*(1-2), 97-104.

Dell'Era, S., Buchrieser, C., Couvé, E., Schnell, B., Briers, Y., Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2009). Listeria monocytogenesl-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. *Molecular Microbiology*, *73*(2), 306-322.

Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by Listeria monocytogenes on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(6), 1552-1561.

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

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(2), 167-193.

Dresch, P., Rosam, K., Grienke, U., Rollinger, J. M., & Peintner, U. (2015). Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores Fomes fomentarius, Fomitopsis pinicola and Piptoporus betulinus. *AMB Express*, *5*(1), 1-14.

Duh, Y. H., & Schaffner, D. W. (1993). Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of Listeria innocua and Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*, *56*(3), 205-210.

Ericsson, D. C. B., & Ivonne, J. N. R. (2009). Sterol composition of the macromycete fungus Laetiporus sulphureus. *Chemistry of Natural Compounds*, *45*(2), 193-196.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, *9*(8), ix-xv.

EFSA, ECDPC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). (2014). The European Union Summary REPORT on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, *12*(2), 3547.

Evans, S., & Kibby, G. (2005). *Fungi (in Hungarian)*. Budapest: Panemex and Grafo.

Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of Listeria monocytogenes. *Letters in Applied Microbiology*, *15*(3), 103-105.

Feng, W., & Yang, J. S. (2010). Studies on chemical constituents of Fomes fomentarius (L. Ex. Fr.). *Chinese Pharmaceutical Journal*, *45*, 1528-1530.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(9), 623-633.

Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*, *189*(22), 7945-7947.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563-575.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (1999). *Report of the FAO expert consultation on the trade impact of Listeria in fish products. FAO fisheries report no. 604*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Gambino, M., & Cappitelli, F. (2016). Mini-review: biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*, *32*(2), 167-178.

Gay, M., Cerf, O., & Davey, K. R. (1996). Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of Listeria monocytogenes at 14 C. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*(4), 433-438.

Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., & Farver, T. B. (1991). Growth and survival of Listeria monocytogenes in market cheeses stored at 4 to 30 C. *Journal of Food Protection*, *54*(9), 662-668.

George, A. E., & Levett, P. N. (1990). Effect of temperature and pH on survival of Listeria monocytogenes in coleslaw. *International Journal of Food Microbiology*, *11*(3-4), 345-349.

George, S. M., Lund, B. M., & Brocklehurst, T. F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of Listeria monocytogenes. *Letters in Applied Microbiology*, *6*(6), 153-156.

Gilbert, R.J., De Louvois, J., Donovan, T., Hooper, W.L., Nichols, G., Peel, R.N., Ribeiro, C.D., & Roberts, D. (1996). Microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *PHLS Microbiology Digest*, *13*, 41-43.

Gilbertson, R. L. (1981). North American wood-rotting fungi that cause brown rots. *Mycotaxon*, *12*(2), 372-416.

Gill, C. O., Greer, G. G., & Dilts, B. D. (1997). The aerobic growth of Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes in broths and on pork. *International Journal of Food Microbiology*, *35*(1), 67-74.

Göpfert H (1982) Pilze aus jungsteinzeitlichen Siedlungen. *Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde, 124*, 50-70.

Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M. P., & Allerberger, F. (2003). Incidence of fecal carriage of Listeria monocytogenes in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *22*(1), 16-20.

Gründling, A., Burrack, L. S., Bouwer, H. A., & Higgins, D. E. (2004). Listeria monocytogenes regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(33), 12318-12323.

Haight, J. E., Nakasone, K. K., Laursen, G. A., Redhead, S. A., Taylor, D. L., & Glaeser, J. A. (2019). Fomitopsis mounceae and F. schrenkii—two new species from North America in the F. pinicola complex. *Mycologia*, *111*(2), 339-357.

Harding, J. L., & Reynolds, M. M. (2014). Combating medical device fouling. *Trends in Biotechnology*, *32*(3), 140-146.

Hazan, R., Que, Y.A., Maura, D., Strobel, B., Majcherczyk, P.A., Hopper, L.R., Wilbur, D.J., Hreha, T.N., Barquera, B., & Rahme, L.G. (2016). Auto poisoning of the respiratory chain by a quorum-sensing-regulated molecule favors biofilm formation and antibiotic tolerance. *Current Biology*, *26*(2), 195-206.

Heilmann-Clausen, J., & Boddy, L. (2005). Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microbial Ecology*, *49*(3), 399-406.

Heklau, H., & Dörfelt, H. (2015). Feuer-Pilze – zur Geschichte der Beherrschung des Feuers mit Hilfe von Pilzen. *Boletus*, *36*(1):13-24.

Huang, T.Z., Du, D.Y., Chen, Y.Q., Yuan, B., Ju, X.Y., Feng, Y.J., Wang, L., & Jiang, J.H. (2012). Chemical constituents and antitumor activity of fruiting body of Fomes fomentarius. *Mycosystema, 5*, 775-783.

Hudson, J. A., & Mott, S. J. (1993). Growth of Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila and Yersinia enterocolitica on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiology*, *10*(1), 61-68.

Jahn, H. (1990). *Pilze an Bäumen*. Berlin: Patzer Verlag.

Jason, A. C. (1983). A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *49*(6), 513-536.

Junttila, J. R., Niemelä, S. I., & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of Listeria monocytogenes and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Bacteriology*, *65*(4), 321-327.

Käferstein, F. K., Motarjemi, Y., & Bettcher, D. W. (1997). Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(4), 503-510.

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, *31*(2), 224-245.

Kamaruzzaman, N. F., Kendall, S., & Good, L. (2017). Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, *174*(14), 2225-2236.

Kampelmacher, E. H., & van Noorle Jansen, L. M. (1969). Isolation of Listeria monocytogenes from faeces of clinically healthy humans and animals. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, *211*(3), 353-9.

Karaca, B., Cihan, A. Ç., Akata, I., & Altuner, E. M. (2020). Anti-Biofilm and Antimicrobial Activities of Five Edible and Medicinal Macrofungi Samples on Some Biofilm Producing Multi Drug Resistant Enterococcus Strains. Turkish *Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *8*(1), 69-80.

Keepers, T. R., Gomez, M., Celeri, C., Nichols, W. W., & Krause, K. M. (2014). Bactericidal activity, absence of serum effect, and time-kill kinetics of ceftazidime-avibactam against β-lactamase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(9), 5297-5305.

Kirk, P.M. (2016). *Species Fungorum - Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*. http://www. speciesfungorum.org., Erişim Tarihi: 12/01/2021.

Klare, W., Das, T., Ibugo, A., Buckle, E., Manefield, M., & Manos, J. (2016). Glutathione-disrupted biofilms of clinical Pseudomonas aeruginosa strains exhibit an enhanced antibiotic effect and a novel biofilm transcriptome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(8), 4539-4551.

Knøchel, S., & Gould, G. (1995). Preservation microbiology and safety: Quo vadis?. *Trends in Food Science & Technology*, *6*(4), 127-131.

Kolundžić, M., Grozdanić, N.Đ., Dodevska, M., Milenković, M., Sisto, F., Miani, A., Farronato, G., & Kundaković, T. (2016). Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom Fomes fomentarius (L.) Fr., Polyporaceae. *Industrial Crops and Products, 79*, 110-115.

Koutsoumanis, K. P., & Sofos, J. N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, *104*(1), 83-91.

Kreisel, H. (2014). *Ethnomykologie: Verzeichnis der ethnomykologisch, biotechnologisch und toxikologisch relevanten Pilze: Literatur, Kunst, Volksmedizin, Pharmazie, Techniken, Drogen, Toxine, Farbstoffe*. Jena: Weissdorn-Verlag.

Kureljusic, J., Rokvic, N., Pavlovic, M., Kureljusic, B., Nesic, K., Tasic, A., & Radovanovic, R. S. (2019). Listeria monocytogenes contamination in ready to eat foods. M. F. Furnols & B. Lakicevic (Eds.), *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (p. 012072). Serbia: IOP Publishing.

Kyere, E. O., Foong, G., Palmer, J., Wargent, J. J., Fletcher, G. C., & Flint, S. (2020). Biofilm formation of Listeria monocytogenes in hydroponic and soil grown lettuce leaf extracts on stainless steel coupons. *LWT, 126*, 109114.

Lado B, Y. A. & Yousef, A.E. (2007). Characteristics of Listeria monocytogenes important to food processors. E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis and food safety* (pp. 157-213). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

Lamon, S., Meloni, D., Consolati, S. G., Mureddu, A., & Mazzette, R. (2015). Use of multi-locus sequencing typing as identification method for the food-borne pathogen Listeria monocytogenes: a review. *Veterinary Science Development*, *5*(5753), 72-77.

Lanciotti, R., Massa, S., Guerzoni, M. E., & Fabio, G. D. (1992). Light butter: natural microbial population and potential growth of Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica. *Letters in Applied Microbiology*, *15*(6), 256-258.

Liu, X., Tong, W., Wu, Z., & Jiang, W. (2013). Poly (N-vinylpyrrolidone)-grafted poly (dimethylsiloxane) surfaces with tunable microtopography and anti-biofouling properties. *RSC Advances*, *3*(14), 4716-4722.

Lovett, J., Bradshaw, J. G., Francis. D. W., Crawford, R. G., Donnelly, C. W., Murthy, G. K. & Wesley, I. V. (1988). Efficacy of high temperature short time pasteurization for inactivation of Listeria monocytogenes in milk. *75th Meeting International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians*, 822, Tampa,FL.

Lüth, S., Boone, I., Kleta, S., & Al Dahouk, S. (2019). Analysis of RASFF notifications on food products contaminated with Listeria monocytogenes reveals options for improvement in the rapid alert system for food and feed. *Food Control*, *96*, 479-487.

MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M., & Reeves, D. S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of Listeria spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *International Journal of Food Microbiology*, *21*(4), 325-334.

Mackey, B. M., & Kerridge, A. L. (1988). The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *International Journal of Food Microbiology*, *6*(1), 57-65.

Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Savoie, L. (1991). Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of Listeria monocytogenes to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(7), 1969-1973.

McClure, P. J., Roberts, T. A., & Oguru, P. O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of Listeria monocytogenes on gradient plates and in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology*, *9*(3), 95-99.

McKellar, R. C., & Knight, K. (2000). A combined discrete–continuous model describing the lag phase of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, *54*(3), 171-180.

McLauchlin, J., Rees, C. E. D., & Dodd, C. E. R. (2014). Listeria monocytogenes and the Genus Listeria. *The Prokaryotes [Internet]*. *Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*, 241-259.

McMeekin, T. A., Olley, J., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. (1993). Predictive microbiology: theory and application. *Biotechnologia*, *2*(25), 181-182.

Mellin, C. J. (1786). *Die Hausmittel: ein Wörterbuch für Jedermann. Zum Besten der Armen*. Rempten: Bei dem Verfasser.

Membré, J. M., Ross, T., & McMeekin, T. (1999). Behaviour of Listeria monocytogenes under combined chilling processes. *Letters in Applied Microbiology*, *28*(3), 216-220.

Midelet, G., Kobilinsky, A., & Carpentier, B. (2006). Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of Listeria monocytogenes from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), 2313-2321.

Moltz, A. G., & Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by Listeria monocytogenes under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, *68*(1), 92-97.

Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *29*(4), 407-439.

Nolan, D. A., Chamblin, D. C., & Troller, J. A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of Listeria monocytogenes and Listeria innocua. *International Journal of Food Microbiology*, *16*(4), 323-335.

Norwood, D. E., & Gilmour, A. (2001). The differential adherence capabilities of two Listeria monocytogenes strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, *33*(4), 320-324.

Nowak, J., Cruz, C. D., Palmer, J., Fletcher, G. C., & Flint, S. (2015). Biofilm formation of the L. monocytogenes strain 15G01 is influenced by changes in environmental conditions. *Journal of Microbiological Methods*, *119*, 189-195.

O'Neil, H. S., & Marquis, H. (2006). Listeria monocytogenes flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infection and Immunity*, *74*(12), 6675-6681.

Onar O. (2015) Fomitopsis pinicola'nın etanolik ekstresinin In vitro olarak glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri. Doktora tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Ong, K. S., Mawang, C. I., Daniel-Jambun, D., Lim, Y. Y., & Lee, S. M. (2018). Current anti-biofilm strategies and potential of antioxidants in biofilm control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *16*(11), 855-864.

Orhan, A. (2017). Türkiye'nin bazı bölgelerinden toplanan makromantar türlerinin antioksidan aktiviteleri, Master Tezi, *Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Nevşehir.

Pala, S. A., Wani, A. H., & Ganai, B. A. (2019). Antimicrobial potential of some wild Macromycetes collected from Kashmir Himalayas. *Plant Science Today*, *6*(2), 137-146.

Pál-Fám F (2006) Tinders in Székelyland I. Polyporaceaes.l. (in Hungarian). *Moeszia-Erdélyi Gombász*, *3*, 3-12.

Palumbo, F. S., Volpe, A. B., Cusimano, M. G., Pitarresi, G., Giammona, G., & Schillaci, D. (2015). A polycarboxylic/amino functionalized hyaluronic acid derivative for the production of pH sensible hydrogels in the prevention of bacterial adhesion on biomedical surfaces. *International Journal of Pharmaceutics*, *478*(1), 70-77.

Papageorgiou, D. K., & Marth, E. H. (1989). Behavior of Listeria monocytogenes at 4 and 22 C in whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. *Journal of Food Protection*, *52*(9), 625-630.

Park, Y.M., Kim, I.T., Park, H.J., Choi, J.W., Park, K.Y., Lee, J.D., Nam, B.H., Kim, D.G., Lee, J.Y., & Lee, K.T. (2004). Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of Fomes fomentarius. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(10), 1588-1593.

Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of Listeria manocytogenes studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting. *Microbiology*, *134*(8), 2171-2178.

Peintner, U., Pöder, R., & Pümpel, T. (1998). The iceman's fungi. *Mycological Research*, *102*(10), 1153-1162.

Pirie, J. H. (1927). A new disease of veld rodents 'tiger river disease'. *South African Institute for Medical Research*, *3*(13), 163-187.

Pirie, J. H. (1940a). The genus Listerella pirie. *Science*, *91*(2364), 383-383.

Pirie, J. H. (1940b). Listeria: change of name for a genus bacteria. *Nature*, *145*(3668), 264-264.

Pöder, R., & Peintner, U. (1999). Laxatives and the ice man. *The Lancet*, *353*(9156), 926-927.

Poggio, C. (2017). Gutta-percha solvents alternative to chloroform: An in vitro comparative evaluation. *EC Dental Science*, *15*, 51-56.

R Development Core Team. (2019). *R A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing*. https://www.R-project.org/, Erişim tarihi: 15/08/2019.

Reis-Teixeira, F. B. D., Alves, V. F., & Martinis, E. C. P. D. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of Listeria monocytogenes formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(3), 587-591.

Robinson, T. P., Aboaba, O. O., Kaloti, A., Ocio, M. J., Baranyi, J., & Mackey, B. M. (2001). The effect of inoculum size on the lag phase of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, *70*(1-2), 163-173.

Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, *44*(1-2), 83-92.

Rösecke, J., & König, W. A. (2000). Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, *54*(6), 603-610.

Ross, T. (1993). A philosophy for the development of kinetic models in predictive microbiology. Doktora tezi, Tazmanya Üniversitesi, Avustralya.

Rutalek, R. (2002). Ethnomykologie–Eine Übersicht. *Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde*, *11*, 79-94.

Ryvarden, L., & Gilbertson, R. L. (1993). *European Polypores Vol: 1-2, Synopsis Fungorum 6.* Oslo, Norway: Fungiflora.

Saar, M. (1991). Fungi in Khanty folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *31*(2), 175-179.

Santos, T., Viala, D., Chambon, C., Esbelin, J., & Hébraud, M. (2019). Listeria monocytogenes biofilm adaptation to different temperatures seen through shotgun proteomics. *Frontiers in Nutrition*, *6*, 89.

Schwarze, F. W., Engels, J., & Mattheck, C. (2013). *Fungal strategies of wood decay in trees*. Heidelberg: Springer Verlag.

Seeliger, H.P.R. (1961) *Listeriosis*. New York: Haffner.

Seeliger, H. P. R., & D. Jones. (1986). Genus Listeria Pirie, 1940. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2* (pp. 1235-1245). Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Shahamat, M., Seaman, A., & Woodbine, M. (1980). Survival of Listeria monocytogenes in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, *246*(4), 506-511.

Sun, D., Li, N., Zhang, W., Yang, E., Mou, Z., Zhao, Z., Liu, H., & Wang, W. (2016). Quercetin-loaded PLGA nanoparticles: a highly effective antibacterial agent in vitro and anti-infection application in vivo. *Journal of Nanoparticle Research*, *18*(1), 3.

Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix–an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, *9*(5), 222-227.

Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, *9*(10), 1236-1243.

Tabrizi, M. A., & Marsal, L. F. (2019). Electrochemical Biosensors Based on Green Synthesized Graphene and Graphene Nanocomposites. B. Palys (Eds.), *Handbook of Graphene, Volume 6: Biosensors and Advanced Sensors* (p. 233). New York: John Wiley & Sons.

Talon, R., Grimont, P. A. D., GRIMONT, F., Gasser, F., & Boeufgras, J. M. (1988). Brochothrix campestris sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), 99-102.

Tienungoon, S. (1998). Some aspects of the ecology of Listeria monocytogenes in salmonid aquaculture. Doktora Tezi, Tazmanya Üniversitesi, Avustralya.

Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2000). Growth limits of Listeria monocytogenesas a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(11), 4979-4987.

Tomičić, R. M., Čabarkapa, I. S., Vukmirović, Đ. M., Lević, J. D., & Tomičić, Z. M. (2016). Influence of growth conditions on biofilm formation of Listeria monocytogenes. *Food and Feed Research*, *43*(1), 19-24.

Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, *1*(3), 00014.

Walker, S. J., Archer, P., & Banks, J. G. (1990). Growth of Listeria monocytogenes at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, *68*(2), 157-162.

Way, S. S., Thompson, L. J., Lopes, J. E., Hajjar, A. M., Kollmann, T. R., Freitag, N. E., & Wilson, C. B. (2004). Characterization of flagellin expression and its role in Listeria monocytogenes infection and immunity. *Cellular Microbiology*, *6*(3), 235-242.

Wilkins, P. O., Bourgeois, R., & Murray, R. G. E. (1972). Psychrotrophic properties of Listeria monocytogenes. *Canadian Journal of Microbiology*, *18*(5), 543-551.

Wilkinson, B. J., & Jones, D. (1977). A numerical taxonomic survey of Listeria and related bacteria. *Microbiology*, *98*(2), 399-421.

Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, *7*(1), 1-7.

Wuenscher, M. D., Köhler, S., Bubert, A., Gerike, U., & Goebel, W. (1993). The iap gene of Listeria monocytogenes is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology*, *175*(11), 3491-3501.

Yamashita, S., Hattori, T., & Abe, H. (2010). Host preference and species richness of wood-inhabiting aphyllophoraceous fungi in a cool temperate area of Japan. *Mycologia*, *102*(1), 11-19.

Yang, Z., Du, R., Chang, A., Zhang, J., & Li, Q. (2013). The In Vitro Anti-Biofilm Activity Of The Etoac Extract Of Poria Cocos Against Escherichia Coli. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, *1*(4), 152-156.

Yilmaz, M. T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *42*(Sup. 2), 1423-1429.

Yokoyama, A., Natori, S., & Aoshima, K. (1975). Distribution of tetracyclic triterpenoids of lanostane group and sterols in the higher fungi especially of the Polyporaceae and related families. *Phytochemistry*, *14*(2), 487-497.

Zang, Y., Xiong, J., Zhai, W.Z., Cao, L., Zhang, S.P., Tang, Y., Wang, J., Su, J.J., Yang, G.X., Zhao, Y., & Fan, H. (2013). Fomentarols A–D, sterols from the polypore macrofungus Fomes fomentarius. *Phytochemistry*, *92*, 137-145.

Zapora, E., Wolkowycki, M., Bakier, S., & Zjawiony, J. K. (2016). Phellinus igniarius: A pharmacologically active polypore mushroom. *Natural Product Communications*, *11*(7), 1934578X1601100741.

Zíbarová, L. (2006). *Phellinus hartigii*. http://www.mykologie.net/index.php/houby/podle-morfologie/chorose/item/151-phellinus-hartigii, Erişim Tarihi: 12/01/2021.

Zilelidou, E., Manthou, E., & Skandamis, P. (2016). Growth differences and competition between Listeria monocytogenes strains determine their predominance on ham slices and lead to bias during selective enrichment with the ISO protocol. *International Journal of Food Microbiology*, *235*, 60-70.

EKLER

EK A - İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

Tabanı düz mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
Tabanı Düz 24 Saat	4	0,0002	4,5900e-05	1,1003	0,3718
Artıklar	35	0,0015	4,1714e-05		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.

U-tabanlı mikroplaka ile 24 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
U-Tabanlı 24 Saat	4	0,00003	8,3125e-06	1,2981	0,2897
Artıklar	35	0,00022	6,4036e-06		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.

Tabanı düz mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
Tabanı Düz 48 Saat	4	0,00002	4,8120e-06	0,0956	0,9832
Artıklar	35	0,00176	5,0364e-05		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.

U-tabanlı mikroplaka ile 48 saat inkübe edilmiş örneğe ait sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
U-Tabanlı 48 Saat	4	8,90e-06	2,2250e-06	0,1068	0,9794
Artıklar	35	7,29e-04	2,0829e-05		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.

***P. hartigii* kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesine ait sonuçların karşılaştırılması**

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
P. hartigii kloroform	3	0,00001059	3,5310e-06	0,0575	0,9815
Artıklar	28	0,00172062	6,1451e-05		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.

***P. hartigii* aseton ekstraktının antibiyofilm aktivitesine ait sonuçların karşılaştırılması**

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
P. hartigii aseton	3	0,00002559	8,5310e-06	0,1007	0,9589
Artıklar	28	0,00237212	8,4719e-05		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.

F. pinicola kloroform ekstraktının antibiyofilm aktivitesine ait sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H_0: Üç tekrarlı sonuç istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Toplam Sq	Ortalama Sq	F Değeri	Pr(>F)
F. pinicola kloroform	3	0,00002425	8,0833e-06	1,9985	0,137
Artıklar	28	0,00011325	4,0446e-06		

p-değeri ≥ 0,05 olduğundan dolayı, H_0 hipotezi kabul edilmiştir.