



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOMBU ÇAYININ *Escherichia coli* O157:H7 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Maryam KARGAR AGHBOLAGH

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Hilal ÇOLAK

Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi, Tezli Yüksek Lisans Programı

Haziran, 2024

## TEZ KABUL VE ONAYI

Maryam KARGAR AGHBOLAGH tarafından, Prof. Dr. Hilal ÇOLAK danışmanlığında hazırlanan “KOMBU ÇAYININ *Escherichia coli* O157:H7 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 25/06/2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Hilal ÇOLAK	
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Besin Hijyeni ve Teknolojisi	<input type="checkbox"/> Ret
	Anabilim Dalı	
ÜYE	Prof. Dr. Hamparsun	
	HAMPİKYAN	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Beykent Üniversitesi	<input type="checkbox"/> Ret
	Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü	
ÜYE	Prof. Dr. Enver Barış	
	BİNGÖL	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa	<input type="checkbox"/> Ret
	Besin Hijyeni ve Teknolojisi	
Anabilim Dalı		

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

**Maryam KARGAR AGHBOLAGH**

(İmza)



Aileme ithaf ediyorum...

## **BÜTÇE DESTEKLERİ**

### **KOMBU ÇAYININ *Escherichia coli* O157:H7 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden çalışmamın gerçekleştirilmesine kadar tüm aşamalarda yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Hilal ÇOLAK'a,

Tezimin deneysel aşamasında büyük yardım ve desteklerini gördüğüm İran Ardabil Azad Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Sayın Dr. Mohamad Zaefizadeh'e,

Eğitim hayatımın her anında maddi ve manevi olarak daima yanımda olan, sabır ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli ebeveynlerime sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2024

**Maryam KARGAR AGHBOLAGH**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	ix
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE.....</b>	<b>4</b>
2.1. Kombucha ve Kombu Çayı.....	4
2.2. Kombu Çayının Kimyasal Bileşimi ve Üretimi.....	7
2.3. <i>Enterobacteriaceae</i> familyası ve <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.4. <i>E. coli</i> 'nin sınıflandırılması.....	10
2.5. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	11
2.6. Kombucha'nın Antimikrobiyel ve Antifungal Etkisi.....	12
<b>3. YÖNTEM.....</b>	<b>16</b>
3.1. GEREÇ.....	16
3.1.1. Kombu Çayı Üretimi ve Ekstraksiyonu.....	16
3.1.2. Laboratuvarında Kullanılan Alet-Ekipman ve Cihazlar.....	16
3.1.3. <i>E. coli</i> O157:H7 Üretimi.....	16
3.2. YÖNTEM.....	16
3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Antibakteriyel Etkinin Belirlenmesi.....	18
3.2.2. Moleküler Analiz için Kaynatma Yöntemi Kullanılarak DNA Ekstraksiyonu.....	18
3.2.3. Nanodrop Kullanılarak DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	18
3.2.4. Genlerin PCR Yöntemi ile Tanımlanması.....	18
3.2.5. Elektroforez .....	20
3.2.6. Real Time PCR (RT-PCR) .....	20
3.2.7. <i>E. coli</i> O157: H7 Üretilmesi ve RNA Ekstraksiyonu .....	20

3.2.8. MMLV Enzimi Kullanılarak Tek Sarmallı cDNA Sentezi .....	22
3.2.9. Primer Hazırlanması .....	22
3.2.10. Gen Ekspresyonu (İfadesi) Veri Analizi .....	23
3.2.11. İstatistiksel Analiz .....	23
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>24</b>
4.1. <i>E. coli</i> O157:H7 Üretimi ve Antibiyogram Sonuçları .....	24
4.2. Kombu Çayı Ekstraktlarına ait İnhibisyon Testleri .....	25
4.3. <i>E. coli</i> O157:H7 için Farklı Genlerin Mevcudiyetinin Belirlenmesi.....	25
4.4. DNA Kalitesi.....	31
4.5. Genlerin Ekspresyonu (İfadesi).....	32
4.6. Primerlerin Etkinliğinin Belirlenmesi.....	42
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>43</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>50</b>
<b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI .....</b>	<b>55</b>
<b>ETİK KURUL İZİN YAZISI.....</b>	<b>56</b>
<b>KURUM İZİNİ YAZILARI.....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>58</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> familyası .....	9
Şekil 3.1. Analiz basamakları akış şeması.....	17
Şekil 4.1. Sorbitol MacConkey Agar besiyerinde üreyen <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>E. coli</i> kolonileri.....	24
Şekil 4.2. Tetrasiklin disklerinin <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki inhibisyon etkisi .....	25
Şekil 4.3. Kombu çayı için inhibisyon konsantrasyonu belirlenmesi .....	28
Şekil 4.4. <i>E. coli</i> O157:H7 suşunda h ve F genlerinin yokluğu .....	29
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> O157:H7 suşunda B e dc geninin varlığı .....	29
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> O157:H7 suşunda Aym geninin varlığı, fhk genlerinin yokluğu .....	30
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> O157:H7 suşunda G ve f genlerinin yokluğu .....	30
Şekil 4.8. Örneklerden ekstrakte edilen DNA'nın varlığı .....	31
Şekil 4.9. Ekstrakte edilen DNA'nın 260/280 nm dalga boyunda kalitesinin kontrol edilmesi.....	31
Şekil 4.10. Ekstrakte edilen RNA'nın nitelik ve niceliğinin belirlenmesi .....	32
Şekil 4.11. Kombu çayının Tetm geni üzerindeki etkisi .....	33
Şekil 4.12. Kombu çayının Tety geni üzerindeki etkisi .....	34
Şekil 4.13. Kombu çayının Teta geni üzerindeki etkisi .....	35
Şekil 4.14. Kombu çayının Tetc geni üzerindeki etkisi .....	36
Şekil 4.15. Kombu çayının Tete geni üzerindeki etkisi .....	37
Şekil 4.16. Kombu çayının Tetd geni üzerindeki etkisi .....	38
Şekil 4.17. Kombu çayının Tetb geni üzerindeki etkisi .....	39
Şekil 4.18. Kombu çayının Stx1 geni üzerindeki etkisi .....	40
Şekil 4.19. Kombu çayının Stx2 geni üzerindeki etkisi .....	41
Şekil 4.20. Çalışmada kullanılan primerlerin etkinliğinin belirlenmesi .....	42

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

Tablo 3.1. PCR için kullanılan malzemeler.....	19
Tablo 3.2. PCR için kullanılan primerlerin özellikleri.....	19
Tablo 3.3. PCR için kullanılan sıcaklık ve süreler.....	19
Tablo 3.4. Kullanılan primerlerin özellikleri.....	22
Tablo 3.5. QPCR için gerekli malzemeler.....	22
Tablo 3.6. Kullanılan termocycler program çizelgesi .....	23
Tablo 4.1 Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında <i>E. coli</i> O157:H7 için zon boyutları.....	25

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### Simgeler Açıklama

°C	: Celcius Derece
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
kg	: Kilogram
g	: Gram
L	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
dk	: Dakika
sn	: Saniye
Sa	: Saat

### Kısaltmalar Açıklama

DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
dNTP	: Dinükleotidtrifosfat
DEPC	: Dietilpirocarbonat
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
FDA	: Food and Drug Administration
TAE 50X	: Tris-asetat-EDTA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	: Realtime Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	: Milyonda bir kısım
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
kob	: Koloni oluşturan birim

<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>ETEC</b>	: Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
<b>EPEC</b>	: Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
<b>EHEC</b>	: Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
<b>EIEC</b>	: Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
<b>EAEC</b>	: Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
<b>DAEC</b>	: Diffuz adherent <i>Escherichia coli</i>
<b>STEC</b>	: Shiga-toksijenik <i>Escherichia coli</i>
<b>STX</b>	: Shiga Toksini
<b>HUS</b>	: Hemolitik Üremik Sendrom
<b>TTP</b>	: Trombotik Trombositopenik Purpura
<b><i>S. aureus</i></b>	: <i>Staphylococcus aureus</i>

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### KOMBU ÇAYININ *Escherichia coli* O157:H7 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Maryam KARGAR AGHBOLAGH

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman : Prof. Dr. Hilal ÇOLAK

“Kombucha”, ülkemizde “Kombu” adıyla bilinen, bir grup faydalı maya ve bakteriyi içeren bir polisakkarit tabakasıdır. Kombucha ile tatlı bir tada ve uygun asitliğe sahip Kombu çayı olarak adlandırılan fermente bir içecek üretilir. Bir yandan, antibiyotiklerin sayı ve türlerindeki sınırlama, diğer yandan bakteriyel enfeksiyonlarda çoklu ilaç direncinin oluşması, insanlığın yeni antibakteriyel kaynak arayışını arttırmaktadır. Bu bağlamda, Kombu çayının çeşitli mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkiler de son zamanlarda araştırılan konular arasında yer almaktadır. Bu çalışma, Kombu çayı olarak bilinen fermente içeceğin, *Escherichia coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Antibakteriyel aktivite disk difüzyon yöntemi ile, hedef genlerin ekspresyonu ise Real time PCR tekniği ile araştırılmıştır.

Analiz sonuçlarına göre, Kombu çayının sulu ekstraktının bakteri üzerinde önemli bir inhibitör etkisi olduğu ve bu organizmanın klinik belirtilerdeki virülans göstergelerinden biri olan Stx2 gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azaltıcı etki gösterdiği ( $P<0.01$ ) bulunmuştur.

Sonuç olarak, Kombu çayı ekstraktının *Escherichia coli* O157:H7'nin gelişimini ve çoğalmasını engelleyebileceği, ayrıca gen ekspresyonunu azaltabileceği saptanmıştır. Kombu çayının antibakteriyel etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için çeşitli patojenler üzerinde araştırmaların artırılması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir.

Haziran 2024, 72 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Kombu çayı, Kombucha, *Escherichia coli* O157:H7, Antibakteriyel etki.

## ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

[INVESTIGATION of ANTIBACTERIAL EFFECT of KOMBUCHA TEA on  
*Escherichia coli* O157:H7 ]

[Maryam KARGAR AGHBOLAGH]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Food Hygiene and Technology

Programme of Food Hygiene and Technology

[Supervisor : Prof. Dr. Hilal ÇOLAK ]

[Kombucha”, known as “Kombu” in our country, is a polysaccharide layer containing a group of beneficial yeasts and bacteria. Kombucha produces a fermented beverage called Kombucha, which has a sweet taste and appropriate acidity. On the one hand, the limitation in the number and types of antibiotics, and on the other hand, the emergence of multidrug resistance in bacterial infections, increases humanity's search for new antibacterial resources. In this context, the antimicrobial effects of kombucha on various microorganisms are among the topics that have been researched recently. This study was conducted to investigate the antibacterial effect of the fermented beverage known as Kombucha tea on *Escherichia coli* O157:H7. Antibacterial activity was investigated by disk diffusion method, and expression of target genes by Real time PCR technique.

According to the analysis results, it was found that the aqueous extract of Kombucha had a significant inhibitory effect on the bacterium and had a statistically significant reducing effect ( $P<0.01$ ) on Stx2 gene expression, which is one of the virulence indicators of this organism in clinical symptoms.

In conclusion, it was determined that Kombucha tea extract can inhibit the development and proliferation of *Escherichia coli* O157:H7 and also reduce gene expression. In order to better understand the antibacterial effect of Kombucha tea, it is necessary to increase research on various pathogens and elucidate its mechanisms of action. ]

June 2024, [72] pages.

**Keywords:** [Kombucha tea, Kombucha, *Escherichia coli* O157:H7, Antibacterial effect. ]

## 1. GİRİŞ

Günümüzde çeşitli ilaçların ve kimyasal koruyucuların zararları ve yan etkileri nedeniyle, bitkisel doğal bileşiklere ve faydalı mikroorganizmalara olan ilgi artmaktadır. Özellikle doğal kaynaklardan elde edilen çeşitli maddelerin antibakteriyel olarak kullanımı gündemde olan araştırma konuları arasındadır. Son yıllarda, bilim ve endüstri dünyası bu bileşikleri gıda ve ilaç sektörlerinde uygun alternatifler olarak sunmaktadır (Kapp ve Sumner, 2019).

Hastalıkların önlenmesi ve iyileştirilmesi için en yeni yöntemlerden biri, mikrobiyal metabolitlerin veya zararsız mikroorganizmaların kullanılmasıdır. “**Kombucha**”, ülkemizde “**Kombu**” adıyla bilinen, mantar ve bakterilerden oluşan bir ortamdır. Kombucha, aralarında *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Lactobacillus* türlerinin de bulunduğu bir grup faydalı maya ve bakteriyi içeren bir polisakkarit tabakasıdır. Kullanımı geleneksel Çin tıbbına dayanan Kombucha ile tatlı bir tada ve uygun asitliğe sahip Kombu çayı olarak adlandırılan fermente bir içecek üretilir (Bhattacharya ve diğ., 2020; Reva ve diğ., 2015).

Kombu çayının probiyotik özellikleri, çok çeşitli faydalı bağırsak mikroorganizmalarının varlığından kaynaklanmaktadır. Bu çayın bileşiminde, bağışıklık sistemini güçlendirmede ve bir çok biyolojik fonksiyonda etkili olan B12, folik asit, K vitamini gibi vitaminler, fosfor, metionin ve antioksidan özelliğe sahip bileşikler bulunmaktadır (Ivanisova ve diğ., 2020; Zendeboodi ve diğ., 2020).

Aynı zamanda anti-diyabetik ve anti-kanserojenik özelliklere sahip olduğu da öne sürülen Kombu çayının, sindirim fonksiyonunun iyileştirilmesinde de etkili bir rolü olduğu belirtilmektedir. *Pseudomonas aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* gibi geniş bir pH aralığında üreyebilen ve gıda zehirlenmelerine ve çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilen farklı Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerine de Kombu çayının antibakteriyel etkisi olduğu bildirilmektedir (Bhattacharya ve diğ., 2018; Rajaei ve diğ., 2021).

*Enterobacteriaceae* familyası, insan ve hayvanların bağırsaklarında doğal olarak yaşayan büyük bir Gram negatif basil grubudur. Bu bakteriler, patojenik ve fırsatçı türlere sahip olan, bağırsağın fakültatif anaerobik normal florasının önemli bir parçasıdır. Bu aileye ait bakteriler bitkileri, toprağı ve suyu kirletebilir. Apse, pnömoni, menenjit, sepsis ve idrar yolu enfeksiyonları gibi birçok klinik hastalığa neden olurlar (Bettelheim ve diğ., 1998; Moxley, 2022).

*Enterobacteriaceae* familyasının önemli türlerinden olan *Escherichia coli* (*E. coli*), hayvanların ve insanların bağırsak sistemlerinin normal florasında bulunan bir bakteridir. *E. coli*, 2-4 mikrometre uzunluğunda ve 1-1,5 mikrometre genişliğinde, gram negatif çubuk şeklinde bir bakteridir ve bazı suşların yuvarlak uçlu ve tek, çift zincirli bir kapsülü vardır. Bu bakterilerin hücre duvarı, diğer Gram negatif bakteriler gibi, murin lipoproteini, fosfolipid ve lipopolisakkarit içerir (Anjum ve diğ., 2021).

İnsanlarda hastalıklara neden olan patojen *E. coli* türleri virülans özellikleri, patojenite mekanizmaları, klinik sendromlar ve O:H serotiplerine göre sınıflandırıldığında başlıca; enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvasiv (EIEC), enterohemorajik (EHEC), diffuz adherent (DAEC) ve enteroagregatif (EaggEC) olmak üzere altı grupta toplanmaktadır (Keikha ve Rava, 2017).

*E. coli* O157: H7 gram negatif basil, fakültatif anaerob, 37°C'de pH 7,2'de optimum üreyen, hareketli, % 6,5 NaCl içeren ortamda gelişebilen, donma sıcaklığına dirençli, ışınlamaya ve ısısız uygulamalara dirençsiz bir bakteridir. 24 saatte sorbitolü fermente edememesi,  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesine sahip olmaması ve 44- 45°C'de gelişmemesi veya çok zor gelişebilmesi özellikleri ile diğer *E. coli* suşlarından ayrılmaktadır (Callaway ve diğ., 2009; Mashood ve diğ., 2006).

İnsanlığın karşı karşıya olduğu zorluklardan biri, bakteriyel patojenlerin, mutasyon sonucunda çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesidir (Afshar ve diğ., 2021; Ahmed ve diğ., 2021). *E. coli* türleri de dahil birçok bakteri türünde, zamanla çeşitli antibiyotiklere direnç oluşturan farklı genler ortaya çıkabilmekte ve bakteriler antibiyotiklere dirençli hale gelebilmektedir (Soltani ve diğ., 2007; Vaez ve diğ., 2022 ).

Bir yandan, antibiyotiklerin sayı ve türlerindeki sınırlama, diğer yandan bakteriyel enfeksiyonlarda çoklu ilaç direncinin oluşması, insanlığın yeni antibakteriyel kaynak arayışını arttırmaktadır. Bu bağlamda, Kombu çayının çeşitli mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkiler de son zamanlarda araştırılan konular arasında yer almaktadır. Bu çalışma, Kombu çayı olarak bilinen ve Kombucha denilen bir tür mantardan elde edilen fermente içeceğin, *Escherichia coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.



## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

### 2.1. Kombucha ve Kombu Çayı

Kombucha yaklaşık 2000 yıl önce Çin'in Kuzeydoğusunda keşfedilmiştir. Kombucha'dan üretilen çaya "sonsuz yaşam iksiri" ya da "harika çay" adı verilmiş ve yüzyıllar boyunca insanlar tarafından bağışıklık sistemini güçlendirmek ve sağlıklı yaşam için kullanılmıştır. 20. yüzyılın başlarında, bu içecek Rusya ve Avrupa'da popüler olmuş ve çoğunlukla tıbbi amaçlar için kullanılsa da daha sonra Birinci Dünya Savaşı'nda yaralı askerlere yardım etme amacıyla da kullanıldığı bildirilmiştir (Sittipo ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2022)

1950'lerde Fransa ve Kuzey Afrika'da popüler olan Kombu çayının, 1960'lı yıllarda İsviçreli bilim adamları tarafından bağırsak üzerine yoğurt benzeri özelliklere sahip etkiler gösterdiği ve çok faydalı olduğu iddia edilerek o zamandan beri bu içeceğe dikkat çekilmiştir (Sreeramulu ve diğ., 2000).

Kombucha mantar olarak anılsa da Kombucha bir mantar değil, bakteri ve mayadan oluşan bir kolonidir. Kombucha çayı, bu bakteri kolonisinin şekere ve çaya eklenmesi ve karışımın fermantasyon sürecinin tamamlanması ile yapılır. Kombu çayı, yeşil veya siyah çay esas alınarak hazırlanmaktadır ve hazırlanmasına ilişkin ayrıntılı bilimsel reçeteler mevcuttur. Kombu çayının tadı fermantasyon sırasında meyvemsi ekşi tattan, bir süre sonra hafif sirke tadına dönüşür. Ortaya çıkan sıvı sirke, B vitaminleri ve bir dizi başka kimyasal bileşikleri de içermektedir (Al-Mohammadi ve diğ., 2021; Coelho ve diğ., 2020; İçen ve diğ., 2023; Yang ve diğ., 2022).

Kombu çayının, yüksek tansiyondan kansere kadar birçok hastalığın önlenmesine ve tedavi edilmesine yardımcı olduğu iddia edilmektedir. Bu iddiaların birçoğunun bilimsel dayanağı bulunmamaktadır. Halk arasında paylaşılan deneyimler, Kombu çayının, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve kabızlığı önlemek de dahil olmak üzere probiyotik takviyelerine benzer faydalara sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak Kombu çayının insan sağlığındaki rolüne ilişkin geçerli tıbbi çalışmalar oldukça sınırlıdır ve diğer yandan bu ürünü tüketmenin dikkate alınması gereken riskleri de vardır. Kombu çayı içenlerde mide rahatsızlığı, çeşitli

enfeksiyonlar ve alerjik reaksiyonlar gibi yan etkiler rapor edilmiştir (Kaewkod ve diğ., 2019; İçen ve diğ., 2023; Miranda ve diğ., 2022; Motafeghi ve diğ., 2023).

Kombu çayı genellikle evde steril olmayan koşullar altında demlenmektedir ve bu durum nihai ürünün kontaminasyon olasılığını artırmaktadır. Örneğin, bu ürünü hazırlamak için düşük kaliteli seramik çaydanlıklar kullanıldığında, Kombu çayındaki asitler seramik sırandan kurşunu çıkarabileceğinden kurşun zehirlenmesi meydana gelebilir (Laureys ve diğ., 2020).

Fermentasyon süreci, ilk önce kültür ortamındaki mayaların sakkaroz şekerini parçalayıp glikoz ve fruktoz üretmesini sağlayacak şekilde gerçekleşir. Fruktoz izomerizasyonla glikoza dönüştürülür, bir sonraki aşamada bu şekerler mayalar tarafından tüketilerek alkol ve CO<sub>2</sub> üretilir. CO<sub>2</sub> içecekte kalır ve karbonatlaşmasına neden olur. Alkol doğru miktarda üretildiğinde, büyümeleri ve üremeleri için karbon kaynağını kullanan bakterilerin büyümesine ortam uygun hale gelir ve bakteriler aktifleşerek alkolü asetik asit, laktik asit, glukonik asit ve benzeri asitlere dönüştürür. Glukuronik asit. Bu içecek B vitaminleri ve folik asitin yanı sıra antibakteriyel özelliklere sahip osmik asit içerir (Ansari ve diğ., 2019; Pei ve diğ., 2020).

Kombu çayının sağlık üzerine öne sürülen bazı olumlu etkileri ve özellikleri aşağıda verilmiştir: (Kapp ve Sumner, 2019)

**Zengin antioksidan kaynağı olması:** Kombu çayının özellikleri üzerine, hastalıkları iyileştirmeye ve tedavi etmeye odaklanılan birçok araştırma yapılmıştır. Bu içecek, güçlü antioksidanlar içermekte olup, ayrıca hastalıklara karşı korunmaya da yardımcı olabilmektedir. Kombucha enflamasyonu ve hastalık riskini azaltmaya yardımcı olur. Ayrıca detoksifikasyon özellikleri nedeniyle çeşitli kanser türlerinin riskini potansiyel olarak azaltır.

**Bağırsak sağlığını destekleyici etkileri:** Kombucha şurubu antioksidan özelliği ile sindirim sistemini serbest radikallerden korur. Yararlı asitler, probiyotikler, amino asitler ve çeşitli enzimler içermesi nedeniyle sindirim ve emilimde oldukça faydalıdır. Bilim adamları tarafından yapılan son araştırmalar, bu içeceğin mide ülserlerini önleme ve tedavi etme yeteneğini kanıtlamıştır.

**Akciğer sağlığı üzerine etkileri:** Silikozis gibi akciğer hastalıklarının tedavisinde bir yöntem olarak Kombucha içeceğinden faydalanılmıştır. Çinli bilim adamları, içmenin yanı sıra

kombuchayı solumanın bile akciğer hastalıklarını tedavi etmenin bir yolu olabileceğini belirtmektedirler.

**Ruh sağlığı üzerine etkileri:** Kombucha sadece yiyeceklerin daha iyi sindirilmesine yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda zihni de koruyabilir. Bu içecek yararlı B grubu vitaminleri, özellikle B12 içerir. Enerji seviyelerini ve konsantrasyonu iyileştirerek zihinsel sağlığı artırır. Elbette fiziksel sağlığın da ruh sağlığı üzerinde etkisi vardır. Depresyon bazen ince bağırsak gibi sindirim sorunlarının bir belirtisi de olabilir. Bu içecek, fermantasyon işlemi sırasında siyah çaydan mümkün olduğu kadar çok demir, kafein ve B vitamini emer. Kombucha ieceğindeki serbest demir, şelasyon adı verilen özel bir süreç sayesinde kandaki hemoglobini artırır, dokulara oksijen dağıtımını iyileştirir ve hücresel düzeyde enerji üretim sürecini uyarır, böylece gün boyu enerji ve canlılığın artmasına neden olur.

**Gcl antibakteriyel özellik göstermesi:** Kombucha ayının patojen bakterileri yok edici etkisinin olduğu öne sürülmektedir. Son yıllarda, kombuchanın stafilokoklar, *E. coli*, Shigella, Campylobacter ve Salmonella türlerine karşı antibakteriyel etkisi araştırılmaktadır.

**Diyabetin iyileştirilmesi ve tedavisi:** Kombucha şurubunun, son araştırmalara göre antioksidan özellikleri nedeniyle özellikle tip 2 diyabetin tedavisinde faydalı olabileceği rapor edilmiştir. Kombucha'daki organik asit pankreası korumakta, aynı zamanda şeker hastalarında genellikle zayıf olan karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını da iyileştirebilmektedir.

**Kardiyovasküler sistemin sağlığının iyileştirilmesi:** Kombu ayının kalp-damar sorunlarına oldukça faydalı olabileceği, trigliserit seviyelerini düşürebildiği ve kolesterolü doğal olarak düzenleyebildiği bildirilmektedir.

**Karaciğerin korunması ve yenilenmesi:** Karaciğerin birçok fonksiyonu onu hayati öneme sahip bir organ haline getirmektedir. Tüketilen tüm yiyecekler karaciğerde işlenir. Kombucha ayındaki antioksidanlar karaciğerin korunmasında ve yenilenmesinde faydalıdır ve ilaç ya da kimyasal madde kullanımının zararlarını en aza indirebildiği ne sürülmektedir.

## 2.2. Kombu Çayının Kimyasal Bileşimi ve Üretimi

Kombu çayı, insanlarda bağırsak florasının oluşmasına ve sindirimin iyileştirilmesine yardımcı olabilecek çok çeşitli faydalı probiyotik bakterileri içeren fermente bir içecektir. Kombucha içeceğinin dünyadaki popülaritesi son yıllarda hızla artmaktadır ve Kombucha'yı hazırlamak pratik olarak ucuz ve kolaydır. Kombu çayı tüketimi, kanı temizleyerek ve böbrekleri güçlendirerek bağışıklık sistemini destekler ve vücuttaki toksinleri ortadan kaldırabilir. Ayrıca bağırsakları harekete geçirmede ve sindirim sistemini iyileştirmede de önemli bir rol oynar. Bunun yanı sıra, kombucha, karbonhidratların otolizine, hücre büyümesine ve enerji üretimine yardımcı olan B12 vitamini, B1 vitamini, kalsiyum, metiyonin, folik asit, K vitamini, magnezyum, fosfor ve bakır açısından da zengindir (Al-Mohammadi ve diğ., 2021; Morales, 2020; Wang ve diğ., 2023).

Kombucha faydalı bir içecek olmasına rağmen bazı kişilerde yan etkilere neden olabilmektedir. Bu çayı, kanser, böbrek hastalığı, HIV veya kandida nedeniyle bağışıklık sistemi zayıflamış kişiler, belirli ilaçları alan kişiler, ciddi ağız ve diş enfeksiyonu olan kişiler, kafein, çay veya kahvenin etkilerine duyarlı kişiler, çocuklar, hamile veya emziren kadınlar dikkatli kullanılmalıdır. Kombucha genellikle siyah veya yeşil çayla yapılır. Her ne kadar bu içecek geleneksel demlenmiş çaydan daha az kafein içerse de, kafeinin etkilerine duyarlı kişiler aşırı tüketirlerse kaygılı veya endişeli hissedebilirler (Laureys ve diğ., 2020; Morales, 2020).

Kombu çayının yapımı oldukça basittir ve genellikle siyah ya da yeşil çay kullanılmaktadır. Çayda kullanılması tercih edilen bitkinin yaprakları kaynatılarak yaklaşık olarak 5-10 dk demlenmeye bırakılır. Daha sonra çay yaprakları süzülerek fermentasyon sırasında mikroorganizmaların kullanacağı karbon kaynağı olan şeker eklenir ve sıcaklık fermentasyona elverişli olana kadar beklenir. Sıcaklığın düşmesiyle fermentasyonun başlamasını sağlayan maya-asetik asit bakterilerinin simbiyotik kültürü olan Scoby eklenir ve aerobik şartlarda fermentasyona bırakılır. 7-20 günlük fermentasyon süresinin sonunda tekrar oluşan Scoby sıvı kısmından uzaklaştırılır ve tekrar kullanılmak suretiyle muhafaza edilir. Geriye kalan sıvı soğutularak tüketilir (Battikh ve diğ., 2012; Bishop ve diğ., 2022).

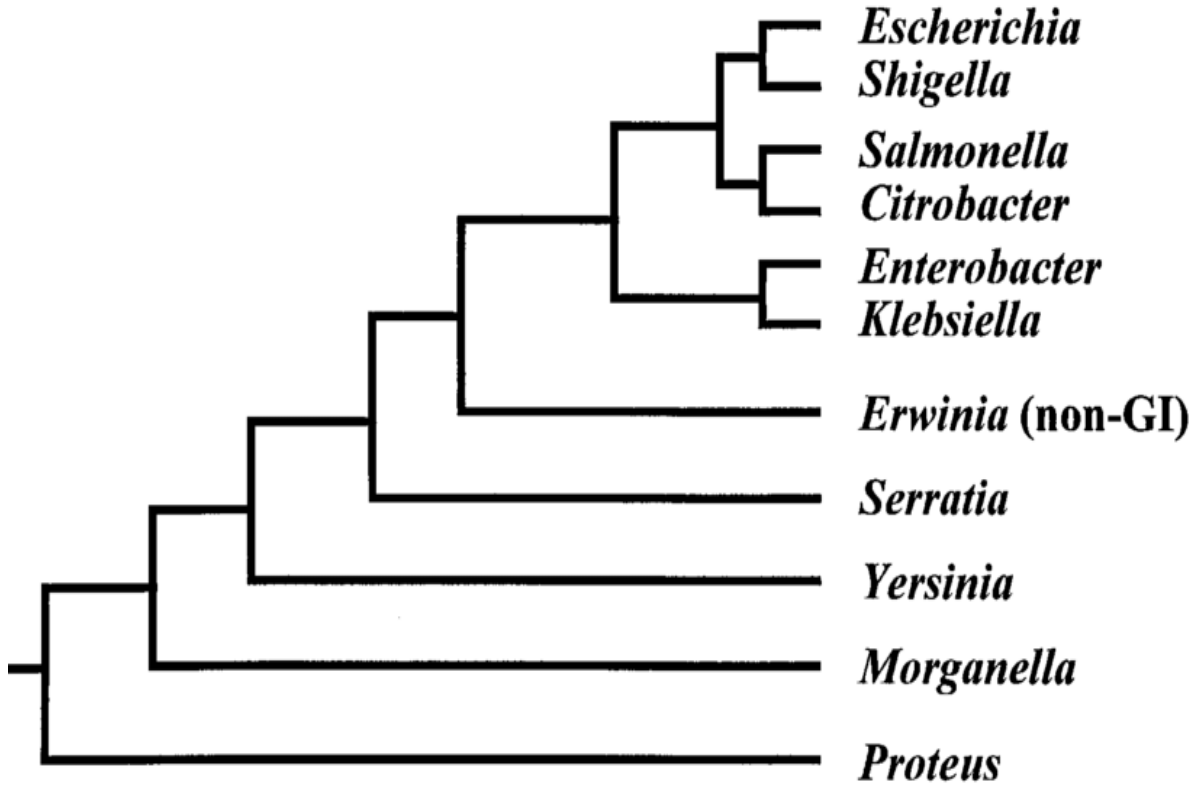
Kombu çayının fermentasyonu mayalar ve asetik asit bakterilerin simbiyotik ilişkisiyle meydana gelmektedir. Mayalar çayda bulunan karbon kaynaklarını etanol ve karbondioksite dönüştürürken, asetik asit bakterileri ise oluşan etanolü asetik, glukonik asit gibi organik asitlere oksitlemektedir (Bishop ve diğ., 2022; Laureys ve diğ., 2020).

Kombu çayının mikroorganizma popülasyonunda kullanılan Scoby'nin tür çeşitliliği, bitki türü, ortamın bileşenleri ve fermentasyon koşulları etkilidir. Ancak genel olarak baskın maya türleri *Zygosaccharomyces* (*Zygosaccharomyces bailii*), *Schizosaccharomyces* (*Schizosaccharomyces pombe*), *Saccharomyces* (*Saccharomyces ludwigii*), *Saccharomyces* (*S.cerevisiae*), *Torulaspora sp.*, *Brettanomyces* (*Brettanomyces bruxellensis*) ve *Pichia sp.* iken, en çok identifiye edilen asetik asit bakterileri *Komagataeibacter* (*Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter kombuchae*) türüdür. Özellikle *Komagataeibacter xylinus* en iyi selüloz üreten türdür. Kombu çayının mikrobiyal yükünde laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*) sayısı ise çok azdır veya bu bakterilere hiç rastlanmaz (Andreson ve diğ., 2022; Pei ve diğ., 2020).

### **2.3. Enterobacteriaceae familyası ve Escherichia coli**

*Enterobacteriaceae* familyası Gram-negatif basillerin en büyük ve en heterojen grubudur. Klinik açıdan önemlidirler ve en az 28 cins ve 7 bağırsak grubu ile 80'den fazla suş bilinmektedir. Bu ailenin cinsleri biyokimyasal özelliklere, antijenik yapıya ve nükleik asit transfeksiyonuna göre sınıflandırılır. *Enterobacteriaceae* bakterileri dünya çapında yayılmış olup hayvanların ve insanların bağırsaklarında yaşarlar ve bitkileri, toprağı ve suyu kirletirler. Apse, pnömoni, menenjit, septisemi ve idrar yolu enfeksiyonları gibi birçok klinik hastalığa neden olurlar. *Enterobacteriaceae* familyası bakterileri fırsatçı ve patojenik bağırsak bakterileri olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu ailenin *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* gibi bazı cinsleri her zaman hastalıklarla ilişkili olan bağırsak patojenleri arasındadır. Ancak *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* ve *Proteus* gibi bazıları doğal bağırsak florasında bulunmaktadır ve koşullar ortaya çıktıkça örneğin plazmitler ve bakteriyofajlar aracılığıyla patojenik genlerin edinilmesi, mikrobiyal floranın karıştırılması, mikrobiyal floranın yer değiştirmesi vb. patojenik güç kazanarak fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilirler (Miranda ve diğ., 2022)

*E. coli* ilk kez Theodor Escherich adlı bir Alman doktor tarafından tanımlanmıştır. 1885 yılında bu organizmaya *Bacterium coli* adını vermiş ve bu bakteriyi bağırsak enfeksiyonlarının ve bazı bağırsak dışı enfeksiyonların ana patojenik ajanı olarak tanıtmıştır. *Bacterium coli* adı, 1919 yılında Castellai ve Kalmers, *Escherichia* cinsini tanımlayıp *Escherichia coli* adını verene kadar yaygın olarak kullanıldı (AbdelGhani ve diğ., 2021).



Şekil 2.1. *Enterobacteriaceae* familyası (Moxley, 2022)

*E. coli*, fakültatif anaerobik bir bakteridir ve insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda bağırsak florasının bir parçasıdır, ancak bazı suşları zatürre, gastroenterit, idrar-genital hastalıklar ve septisemi gibi hastalıklara neden olur. *E. coli* 'nin farklı patojenik varyantları vardır. İnsanlarda ve hayvanlarda çeşitli türlerde bağırsak ve bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olur (Zarei ve diğ., 2018).

*E. coli*'nin başlıca bulaşma yolları:

- Kırmızı sığır eti veya diğer et ürünlerinin yetersiz pişirilerek tüketilmesi
- Kontamine suların içilmesi ve kirli sularda yüzmek
- Kontamine süt tüketimi
- Pastörize edilmemiş meyve sularının tüketimi
- Pişmemiş sebze ve kontamine meyve tüketimi

olarak sayılabilir.

**2.4. *E. coli*'nin sınıflandırılması**

*E. coli*'nin çeşitli somatik antijen O türlerine göre sınıflandırılması ilk kez Kaufman tarafından yapıldı. *Escherichia hermannii*, *Escherichia decarboxylata*, *Escherichia valensii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli* ve *Escherichia blattae* olmak üzere çeşitli türleri tanımlanmıştır. Bunlardan sonuncusu insan vakalarından izole edilememiştir. 1984 yılında yayımlanan Bergeys Manual adlı kitapta DNA bulgularına dayanarak Enterobacteriaceae familyasına ait 20 cinse yer verilmiştir (Abu-El-Azayem ve diğ., 2021)

Virülans faktörlerinin kazanılmasıyla *E. coli* suşları plazmidler, transpozonlar, bakteriyofajlar ve patojenite lokusları gibi bulaşıcı genetik faktörler yoluyla patojenik suşlar haline gelirler. Patojenik *E. coli*, klinik semptomlara göre, diare yapan *E. coli*, idrar yolu patojeni *E. coli*, menenjit ve septisemiye neden olan *E. coli* olarak gruplara ayrılır. Virülans özelliklerine, patojenik mekanizmaya ve klinik semptomlara bağlı olarak çoğu durumda spesifik serogrupları ve serotipleri mevcuttur. Diareye neden olan *E. coli* tipleri kendi içinde altı alt gruba ayrılır: (Keikha ve Rava, 2017).

Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC): Az gelişmiş ülkelerdeki çocuklarda ishalin ana nedeni.

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC): 5 yaşın altındaki çocuklarda ishalin ve gelişmekte olan ülkelerde seyahat eden ishalin nedenidir.

Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC): Suşları görünüm ve patojenite açısından Shigella'ya çok benzer ve Shigella benzeri ishale neden olur.

Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC): EAEC suşu, yaygınlığı giderek artan yeni ortaya çıkan bir patojendir.

Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC): Gelişmiş ülkelerde gıda kaynaklı ishalin nedenlerinden biridir.

Diffuz Adherent *Escherichia coli* (DAEC): 1 ila 5 yaş arası çocuklarda kansız ishale neden olur.

EPEC, genellikle “turist ishali” olarak bilinen ve daha düşük hijyen standartlarına sahip ülkelere seyahat eden insanların karşılaştığı hastalık durumuna sebep olur. Pirinç suyu görünümünde ishal ve kramplar görülür ve genellikle semptomlar birkaç gün içinde düzelir. Bakterinin en önemli kaynağı insanların bağırsağı olarak görülmektedir ve genelde kontamine sudan bulaşır. Çocuk ölümlerinde önemli bir sebeptir. EPEC yine benzer şekilde düşük hijyen standartlarına sahip ülkelerde görülen ve fekal-oral yolla genellikle su kaynaklı bulaşan bir patojendir. Tek bilinen rezervuarı insanların bağırsakları olan EIEC ise yine fekal-oral yolla insanlara bulaşabilmekte ve dizanteri benzeri hastalık tablosu oluşturabilmektedir (FDA, 2012).

## **2.5. *Escherichia coli* O157:H7**

Shiga-toksijenik *E. coli* (STEC), 200 ila 400 arasında serotipi mevcut olan Shiga toksini (Stx) üretebilmeleri ile karakterize olan bakterilerdir. Bunların içinde yalnızca bir kısmı insanlarda ciddi hastalıklara sebep olurlar ve EHEC olarak isimlendirilirler. EHEC kaynaklı vakaların yaklaşık yüzde 75’i *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 suşundan kaynaklanmaktadır. *E. coli* O157:H7 suşu, insanlar ve çiftlik hayvanları arasında önemli bir ortak patojen olarak öne çıkmıştır. Gıda yoluyla bulaşan bu suşun neden olduğu rahatsızlıklar, asemptomatik geçebileceği gibi ölümcül de olabilmektedirler (Mahmoudi ve diğ., 2022; Moxley, 2022).

Vakalarda, normal ishal şeklinde başlayıp sonrasında ciddi mide kramplarının görüldüğü kanamalı ishale dönen, hemorajik kolit tablosu görülebilir. Hastalık bazen daha da ilerleyerek hemolitik üremik sendrom (HUS) veya trombotik trombositopenik purpura (TTP) gibi hayatı tehdit eden rahatsızlıklara da sebep olabilir. Pastörize edilmemiş süt ve meyve suları, kıyım, marul, ıspanak ve hazır kurabiye hamuru gibi pek çok gıdadan kaynaklanmış vakalar rapor edilmiştir. Yoğurt ve fermente sosisler gibi düşük pH’lı gıdalardan da kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Özellikle çocuklar ve bağışıklık sistemi zayıf olan bireyler için tehlikelidir. Kıymanın iyi pişirilmesi, meyve ve sebzelerin akan su altında iyice yıkanması, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketilmemesi alınabilecek önlemlerdir (Callaway ve diğ., 2009; FDA, 2012; Laurenson ve diğ., 2021).

Verotoksijenik *E. coli* suşları vero salgırlar. Verotoksin hücrelerini öldürme yeteneğinden ve salgılanan Shiga nörotoksine benzerliğinden dolayı Shiga benzeri toksin 1 olarak adlandırılmıştır. Bunu üreten gen aynı zamanda bakteriyofaj genomunda da yer almaktadır Hemorajik kolit dahil tehlikeli sendromlara neden olur ve ardından özellikle böbrek yetmezliği meydana gelebilmektedir (Sittipo ve diğ., 2019)

Son yıllarda *Escherichia coli* O157:H7 suşu, insanlar ve çiftlik hayvanları arasında önemli bir ortak patojen olarak öne çıkmıştır. Gıda yoluyla bulaşan bu suş, insanlarda hemolitik üremik sendromun (HUS) nedenidir (Moxley, 2022).

Enterohemorajik *E. coli* çoğu ülkede gıda kaynaklı enfeksiyonların başlıca nedeni olarak bilinmektedir ve bu suşların izolasyonu için sorbitolü fermente edememeleri nedeniyle sorbitol agar gibi seçici besiyerleri kullanılmaktadır (Zarei ve diğ., 2018)

## **2.6. Kombucha'nın Antimikrobiyel ve Antifungal Etkisi**

Kombu çayının baldaki antibakteriyel etkisini araştıran bir araştırmada, balda 1:5 oranında hazırlanan kombinasyonunun bazı mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel etkisi test edilmiştir. *Pseudomonas aerogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Enterococcus faecalis* üzerine 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 mg/ml olmak üzere 8 farklı konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. Bu araştırmada antibakteriyel etkinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar Gram pozitif ve negatif bakteriler arasında en fazla antibakteriyel etkinin sırasıyla 128 ve 256 mg/ml'lik konsantrasyonlarda *Enterococcus faecalis* ve *E. coli* üzerinde olduğunu göstermiştir. Öldürücü etkinin de artan konsantrasyonla orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (Soltani ve diğ., 2020).

Battikh ve diğ. (2013), yaptıkları araştırmada, Kombu çayı hazırlanmasında siyah çay ile iki şıfalı bitkinin kombinasyonunu kullanmışlardır. Antibakteriyel ve antifungal aktivite değerlendirildikten sonra tatmin edici sonuçlar gözleendiği ve Kombu çayının antibakteriyel etkisinin yalnızca asetik asit ve diğer organik asitlerin neden olduğu asitlikten kaynaklanmadığı, daha ziyade proteinler, antibiyotikler, enzimler ve diğer biyosentez ürünleri gibi biyolojik bileşiklerin varlığından kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Kombucha ile fermente edilmiş soya fasulyesi proteininin antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bu içecek ile asetik asidin *S. aureus*, *E. coli* ve *Bacillus subtilis* üzerindeki inhibitör etkisi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, fermente edilmiş soyanın kombucha ile kombinasyonunun bakteriler üzerine inhibe edici etkisinin daha yüksek olduğu ve üretilen asetik asidin tek başına antibakteriyel aktiviteden sorumlu olmadığı belirtilmiştir (Tu ve diğ., 2019).

Mizuta ve diğ. tarafından 2020 yılında yapılan bir araştırmada, Kombu çayının *Alicyclobacillus* spp. üzerine antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, Kombucha ile fermente edilen yeşil çaydan elde edilen ekstraktın aktivitesi test edilmiş ve minimum inhibitör konsantrasyonun ve antibakteriyel konsantrasyonun %12,5 ila %50 aralığında gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Vohra ve diğ. (2019) tarafından Malezya'da yapılan bir çalışmada, fermantasyon süresindeki değişikliklerin Kombu çayının antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmış, yeşil çay ile hazırlanan Kombu çayının disk difüzyon yöntemini kullanarak yapılan antimikrobiyal aktivite değerlendirilmesinde; bu çayın *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *S. marcescens*'e karşı iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın aksine, Brezilya'da 2022 yılında siyah ve yeşil Kombu çayının antibakteriyel aktivitesinin değerlendirildiği bir araştırmada, siyah ve yeşil Kombu çayının, *S. aureus*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermediği belirtilmiştir (Barbosa ve diğ., 2022).

Bassyouni ve diğ. (2023) tarafından Mısır'da yapılan başka bir araştırmada, Kombu çayının vorikonazol ile kombine edilmesinin klinik izolatların vulvovajinal kandidiyazise karşı antifungal aktivitesi incelenmiştir. Araştırmada, 89 suş izole edilmiş ve 60 izolatin değişken direnç gösterdiği (57 izolat vorikonazole dirençli iken 3'ünde doza bağlı duyarlılık olduğu) belirlenmiştir. Kombu çayı, vorikonazolün MIC50 değerini tüm suşlara karşı 5'ten 0,625 µg/mL'ye ( $P<0,01$ ) önemli ölçüde azaltırken, MIC90 değerinin 10'dan 1,25 µg/ml'ye düştüğü, 0,156 µg/mL konsantrasyonundaki vorikonazolün tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında, Kombu çayı süpernatantının eklenmesinden sonra 18 suşun oluşturduğu biyofilmleri yok etmede başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Mısır'da yapılan bir diğer araştırmada, Kombu çayı ekstraktı ile çinko oksit nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi araştırılmış, bu kombinasyonunun antibiyotik kullanmak yerine bakteriyel direnç sorunlarının üstesinden gelmede umut verici bir geleceğe sahip olduğu bildirilmiştir (El-Fallal ve diğ., 2023).

Brewer ve diğ.'nin 2021 yılında ABD'de yaptıkları bir çalışmada, ev yapımı Kombu çayı fermantasyonu sırasında yerel mikrobiyotadaki değişiklikler ile *E. coli* ve *Salmonella*'nın hayatta kalması araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, kombucha ve kombu çayı hazırlamak için kullanılan çay bazında *Salmonella* ve *E. coli*'nin hayatta kalmasının, evsel ortamlarda kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen Kombucha çeşitlerindeki doğal farklılıklara bağlı olduğunu göstermiştir. Bakteri kontaminasyonunu önlemek ve Kombu çayı tüketiminden kaynaklanabilecek hastalık riskini azaltmak için özellikle ev ortamında hazırlanan çaylarda hijyen önlemlerine dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Coelho ve diğ. (2022) tarafından Minas Frescal peynirinin üretiminde Kombucha'nın *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla, deneysel olarak kontamine edilerek üretilen peynirlere Kombucha eklenmesiyle asitlik derecesi, toplam bakteri sayısı, maya, koliform, laktobasil sayılarında ve sertlik ile yapışkanlık değerlerinde önemli değişiklikler gözlendiği rapor edilmiştir.

Akarca (2021) tarafından yılında yapılan bir çalışmada, böğürtlen, ahududu gibi bazı kırmızı meyveler ile üretilen Kombü çayının fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri ile antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmıştır. Fermantasyon sonunda örneklerde en çok potasyum ve magnezyum tespit edilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde kateşin ve gallik asit saptanmıştır. Böğürtlenle üretilen örnekler tüm kriterlerde en çok beğenilenler olmuş, böğürtlen içeren örneklerde en yüksek antibakteriyel ve antifungal etki *S. aureus* ve *Rhizopus nigricans* üzerinde (zon çapı 24,36 ve 20,53 mm) tespit edilmiştir.

Siyah ve yeşil çaydan yapılan kombü çayının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, geleneksel Kombücha kültürüyle yeşil ve siyah çay demlenerek fermente edilen Kombü çayının, bazı patojen bakteriler ve klinik *Candida* türlerine karşı antibakteriyel/antifungal aktiviteleri agar difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Araştırma sonuçları, her iki Kombü çayında da antimikrobiyal potansiyel olduğunu göstermiş, yeşil çay ile fermente edilerek üretilen Kombü çayının en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sonuçlara göre, *Staphylococcus epidermidis* (22 mm), *Listeria monocytogenes* (22 mm) ve *Micrococcus luteus* (21,5 mm) geniş inhibisyon bölgeleri göstermiş, bunun yanı sıra, Kombü yeşil çayının *Candida parapsilosis*'e karşı gösterdiği antifungal etki önemli bulunmuştur (Battikh ve diğ., 2013).

Sreeramulu ve diğ. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada ise, fermantasyonda sakkarozlu (%10 w/v) çay suyu içinde ek olarak bir starter kültür kullanılarak hazırlanan Kombü çayının antimikrobiyal aktivitesi bir dizi patojenik mikroorganizmaya karşı araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, *S. aureus*, *Shigella sonae*, *E. coli*, *Aeromonas Hydrophila*, *Yersinia enterolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloaca*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*'in Kombü çayına duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Kombü çayında oluşan yüksek miktarda asetik asitin bu inhibitör etkiden sorumlu olabileceği ancak, asetik asit ve büyük proteinler dışında antimikrobiyal bileşiklerin de Kombü çayında varlığına işaret etmektedir.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Kombu Çayı Üretimi ve Ekstraksiyonu

Kombu çayı üretimi için, 60 g glikoz, 30 gram sirke ve siyah çaydan demlenmiş çay ve Kombucha mantarı kullanıldı. İlk olarak, 3 L su kaynatılarak bir çaydanlıkta 20 g kuru siyah çaydan (yaklaşık 4-5 çorba kaşığı) çay demlendi. Demlenmiş ve süzölmüş çay içine glikoz ve sirke ilavesinden sonra, Kombucha mantarı eklenerek karışımın üzeri ince bir bezle kapatıldı ve karanlık bir dolapta 10 gün bekletildi. Süre sonunda, süpernatant sıvı filtre kâğıdından süzöldükten sonra, azot atmosferi altında kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 1:1 oranında distile suda çözüldükten sonra, bu stok ekstraktan seyreltmek suretiyle seri sulu çözeltiler (20-100 mg/ml aralığında) hazırlandı.

##### 3.1.2. Laboratuvarda Kullanılan Alet-Ekipman ve Cihazlar

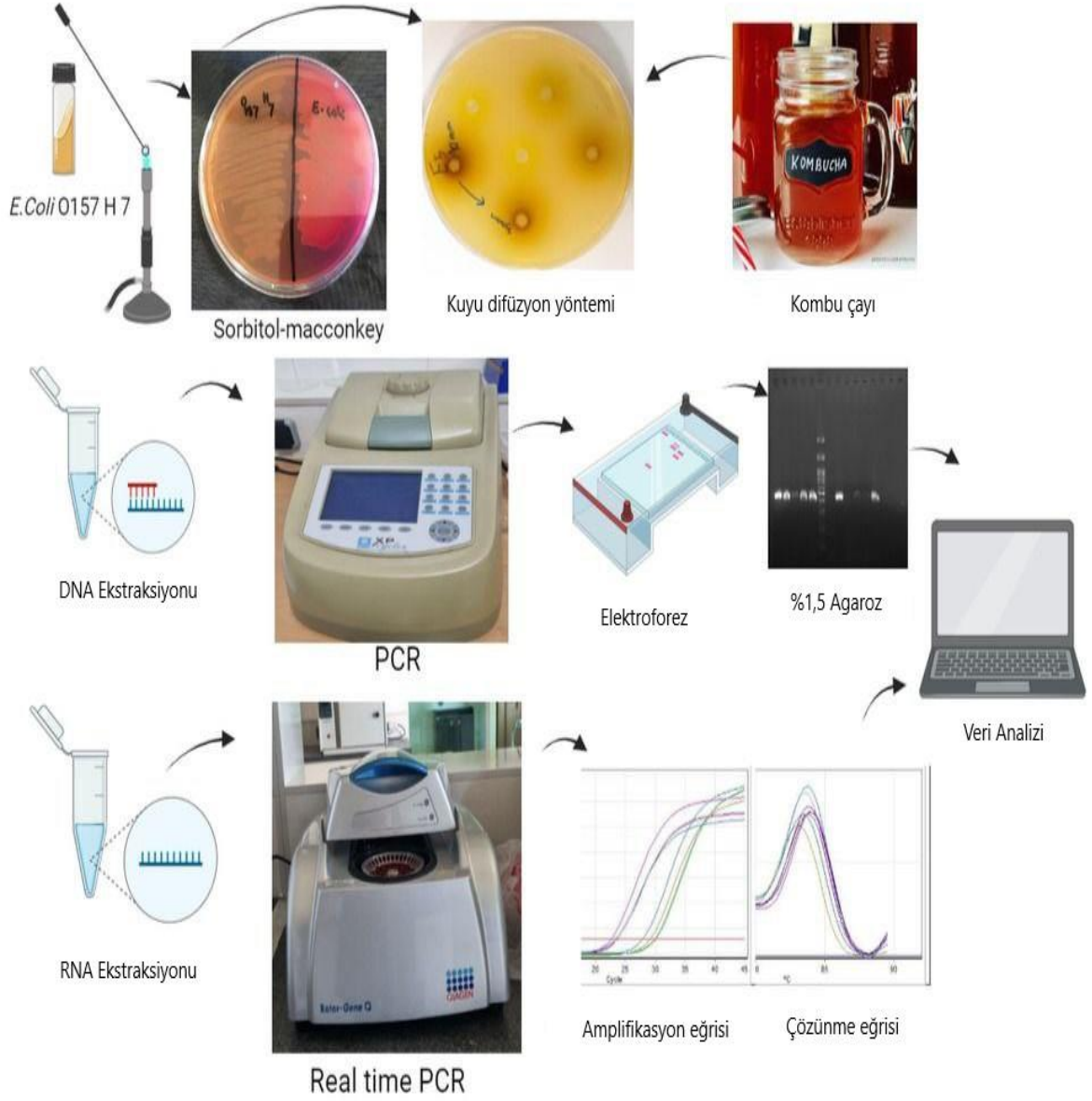
Hassas terazi (Sartorius CP 2245), karıştırıcı vortex (Velp Scientifica Rx3), membran filtre (Milipore, 0,45 mikrometre), filtre kağıdı (Macherey-Nagel), buzdolabı (Bosch Dynamic No-Frost), Real time PCR cihazı (QiaGen), otoklav (Hirayama HG133), inkübatör (Velp FTC120), elektroforez cihazı (BioRad), nanodrop cihazı (ThermoNanoDrop 2000c) su banyosu (Memmert WNB22), santrifüj (Thermo-Fischer Sorwall MX120), cam ve metal laboratuvar malzemeleri.

##### 3.1.3. *E. coli* O157:H7 Üretimi

*E.coli* O157: H7 (ATCC 43895) suşu LB Broth (Merck, M110285) ortamında kültürlendi. Ayırıcı tanısı Sorbitol Macconkey Agar (Merck, 1.00213) besiyerinde yapıldı.

#### 3.2. YÖNTEM

Bu çalışmada yapılan tüm işlemler ve analizler Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



**Şekil 3.1. Analiz basamakları akış şeması**

### 3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Antibakteriyel Etkinin Belirlenmesi

*E. coli* O157:H7'nin duyarlılığı, disk difüzyon yöntemi ile ve CLSI 2019 yönergelerine göre test edildi. Önce katı besiyerinde 24 saatlik bakteri kültürü hazırlandı. Daha sonra, bir öze kullanılarak, saf kültürden alınan tek bir koloni, steril fizyolojik tuzlu su içine aktarıldı. Elde edilen süspansiyonun bulanıklığı 0.5 McFarland bulanıklığı ile kontrol edildikten sonra, Mueller Hinton Agar (Merck. 1.03872) besiyerinde üretildi. Daha sonra 1:1 oranında hazırlanan stok kombu çayı ekstresinden seyreltilerek hazırlanan seri dilüsyonlar emdirilerek kurutulmuş steril kağıt diskler (6 mm çapında), kültür ortamına yerleştirilerek 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından antibakteriyel aktivite, inhibisyon bölgelerinin mm cinsinden (6 mm disk dahil) ölçülmesi ve kaydedilmesiyle değerlendirildi. Kombu çayının antibakteriyel potansiyelini belirlemek amacıyla, ticari antibakteriyel ajanlarla yapılan paralel bir analiz çalışması tetrasiklin diskleri kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, antibiyotik diskleri kültür ortamına yerleştirildikten sonra, 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından, bakteriyel duyarlılık sonuçları, CLSI 2019 tablolarında belirtilen değerlere göre kontrol edildi (Hemeg ve diğ., 2020)

### 3.2.2. Moleküler Analiz için Kaynatma Yöntemi Kullanılarak DNA Ekstraksiyonu

*E. coli* O157:H7'nin DNA'sını ekstrakte etmek için önce bakteriyi içeren 500 µl LB broth besiyerinden alındı ve 1,5 ml'lik mikro tüplere aktarıldı. Mikro tüpler ısıtılmak üzere su banyosunda 96°C sıcaklıkta 15 dk benmari usulü bekletildi. Benmariden çıkarıldıktan sonra soğuk şok için derhal buza aktarıldı ve ardından buzdolabının derin dondurucu kısmında 3 dk bekletildi. Parçalanmış duvarı ve bakterilerden salınan içeriği ayırmak için, iki dk boyunca 13,000 rpm'de santrifüj yapıldı.

### 3.2.3. Nanodrop Kullanılarak DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA'yı yukarıdaki yöntemde bakterilerden ayırdıktan sonra, DNA konsantrasyonunu ölçmek için ThermoNanoDrop 2000c Nanodrop cihazı kullanıldı.

### 3.2.4. Genlerin PCR Yöntemi ile Tanımlanması

PCR için kullanılan malzemeler Tablo 3.1'de, PCR'de kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 3.2' de ve her bir reaksiyonun sıcaklığı ve süresi ise Tablo 3.3' de verilmiştir. "Master mix"

hazırlandıktan sonra istenen DNA örnekleri PCR Master mix'e aktarıldı ve örnekleyici kullanarak dikkatlice pipetlendi. Daha sonra bilinmeyen DNA ve kontrol DNA (ATCC 25922) içeren PCR karışımları hazırlandı (testte kontaminasyonun önlenmesi için her bir PCR testi serisinde pozitif kontrol ve negatif kontrole ait DNA örnekleri bilinmeyen PCR örnekleri ile birlikte alınmalıdır) ve termocycler içerisine yerleştirildi. Tüm primerler Blast'ta ve primerlerin kalitesi ise OligoAnalyzer yazılımı ile kontrol edildi.

**Tablo 3.1. PCR için kullanılan malzemeler**

Mikrolitre (µl) cinsinden miktar	Gerekli malzemeler
12/5	Master mix
1	Primer forward
1	Primer reverse
9/5	DD water
1	DNA template
25	Total hacim

**Tablo 3.2. PCR için kullanılan primerlerin özellikleri**

Dizilim (5'-->3')	Primer	Gen
5`atggaagcccagaaaggatt3` 5`tgccctttggaaatctcag3`	Reverse Forward	Tetm
5`tcgtggcacctaaaaatgaa 3` 5`cgctttatgcgtttatgcag3`	Reverse Forward	Tety
5`gaaagctgcctgttccaaag3` 5`gaaagagcctgatgcactcc3`	Reverse Forward	Tetk
5`ccttcgggatgtagagcttg3` 5`ctgtaccacgaatccgacct3`	Reverse Forward	Tetf

**Tablo 3.3. PCR için kullanılan sıcaklık ve süreler**

Faktör	Sıcaklık (°C)		Süre	
	tetA,B,C,D,G	tetE,H	tetA,B,C,D,G	tetE,H
Başlangıç denaturasyonu	95	95	5 dk	5 dk
Denaturasyon	95	95	20 sn	20 sn
Annealing	55	53	20 sn	20 sn
Extension	72	72	20 sn	20 sn
Final extension	72	72	5 dk	5 dk

### 3.2.5. Elektroforez

Agaroz jel içeren bir tepside yer alan kuyulara, hazırlanan PCR örneğinden 6 µl yavaş yavaş aktarıldı. Elektroforezden sonra jel çıkarılarak Gel-Doc cihazına yerleştirildi. Jelin görüntüsü cihazda ayarlanarak fotoğraflandı. Bu bilgiye göre ve ayrıca pozitif kontrol suşundan elde edilen genler kullanılarak, araştırılan örneklerin her birinde istenen genlerin varlığı veya yokluğu belirlendi.

### 3.2.6. Real Time PCR (RT-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), in vitro koşullarda DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR, basit, spesifik ve hassas bir tekniktir. Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromid veya gümüş nitrat ile boyanarak sonuçlar değerlendirildi.

### 3.2.7. *E. coli* O157: H7 Üretilmesi ve RNA Ekstraksiyonu

*E. coli* O157: H7 ile katı besiyerinde 24 saatlik bakteri kültürü hazırlandı. Daha sonra, bir öze kullanılarak, saf kültürden alınan tek bir koloni, steril fizyolojik tuzlu su içine aktarıldı. Elde edilen süspansiyonun bulanıklığı 0.5 McFarland bulanıklığı ile kontrol edildikten sonra, Mueller Hinton Agar (Merck. 1.03872) besiyerinde üretildi. Daha sonra 1:1 oranında hazırlanan stok kombu çayı ekstresinden seyreltilerek hazırlanan seri sulu çözeltilerden emdirilmiş diskler kültür ortamına yerleştirilerek 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından diskin etrafındaki bakterilerden RNA ekstrakte edildi. Daha sonra hücreler, aşağıda tarif edildiği gibi RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi için kullanıldı.

Tüm plastik kaplar ve çalışma masası %70'lik alkol ile iyice temizlendi. Toplanan bakteriler diskin etrafındaki kuyucuklara aktarıldı. 6 oyuklu plakanın her oyuğuna 500 µl Trisol döküldükten sonra, 20 dk oda sıcaklığında bakteriler tamamen yok olana kadar bekletildi. Daha sonra 6 oyuklu plakanın her bir oyuğunun içeriği 2cc'lik tüplere aktarıldı ve tüpler buza konularak, tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Ardından, tüplerin her birine yaklaşık 200 µl kloroform eklendi ve yavaşça tersine döndürülerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Tüpler 12000 devirde 10 dk santrifüj edildi ve her bir tüpün süpernatantı orta fazı bozmadan yeni 2 cc'lik tüplere dikkatlice aktarıldı.

Daha sonra her bir tüpe örnek hacminin 2,5 katı soğuk izopropanol eklendi ve tüpler birkaç kez ters çevrilerek 24 sa 70°C'de buzlukta bekletildi. Ertesi gün tüpler oda sıcaklığına alınarak, tüplerin içindeki sıvıyı eritmek için tüpler 12000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki sıvı döküldü, Ardından tüplerin her birine 20 µl dietilpirocarbonat (DEPC) su dökerek, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra Nano drop cihazı ile optik absorbansı (OD) ve ml başına ng cinsinden konsantrasyonları ölçüldü. Ekstre edilen RNA'lar, 1X TAE tamponu kullanılarak %2 agaroz jel numunesi üzerinde elektroforeze tabi tutuldu.

**Kuru Nano Dropta dikkat edilmesi gereken noktalar:** 260 nm'de RNA ve DNA'nın OD'si 280 nm'de oluşur ve absorbans 280 nm'de protein kontaminasyon miktarı ve 230 nm, polisakkarit/polifenol kirliliği miktarını göstermektedir. Bu nedenle 260/280 ve 260/230 absorpsiyon oranları RNA'nın saflığını ifade etmektedir, dolayısıyla 1,8 ile 2 arasında bir orana sahip numuneler kontaminasyon açısından en iyi kaliteye sahip olmaktadır.

**TAE 50X (Tris-asetat-EDTA) hazırlanışı:** 242 gr tris üzerine, 57,1 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M Sodyum EDTA eklendikten sonra deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı ve potasyum hidroksit ile pH'ı 8,5'e ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi. TAE 50X tamponundan TAE 1X tamponu hazırlamak için 20 ml TAE 50X stoğu 980 ml deiyonize su ile 1 litreye seyreltildi.

### 3.2.8. MMLV Enzimi Kullanılarak Tek Sarmallı cDNA Sentezi

Mevcut protokollere göre üretilen oligonükleotidler Cinacloon firmasından (Cinacloon Co., İran) liyofilize formda temin edildi. Oligonükleotitlerin seyreltilmesi için steril ve nükleaz içermeyen TE tamponu (pH 7,0) kullanıldı. 0,2 µM hekzamer primer ile kopyalanan 1 µg toplam RNA ters kopyası ve 1 µl dinükleotidtrifosfat (dNTP) ve DEPC ile karıştırıldıktan sonra, 65°C’de 5 dk inkübe edildi, Daha sonra, tüpler PCR sistemine yerleştirildi ve cDNA sentezlemek için cihaza program girildi (25 °C’de 10 dk, 42 °C’de 60 dk ve 72 °C’de 10 dk)

### 3.2.9. Primer Hazırlanması

Kullanılan primerlerin bilgileri Tablo 3.4’de verilmektedir.

**Tablo 3.4. Kullanılan primerlerin özellikleri**

Primer dizilişi	Primer adı
GCAAGCCACGTTTCTCG	<i>Gyraz-F</i>
GGAAGCCGACCTCTCTGATG	<i>Gyraz-R</i>
CCCTCTGACATCAACTGCA	<i>sTx1-f</i>
GACTTCTCGACTGCAAAGACG	<i>sTx1-r</i>
AATGTGCTTCCGGAGTATCG	<i>sTx2-f</i>
TCGCCAGTTATCTGATTCTG	<i>sTx2-r</i>

**Tablo 3.5. QPCR için gerekli malzemeler**

Miktar (µl)	Reaksiyon bileşikleri (20 µL)
7	DEPC
10	Mastermix 2x Real time PCR
1	cDNA (1 µg/ml)
1	Forward primer
1	Reverse primer

**Tablo 3.6. Kullanılan termocycler program çizelgesi**

<b>İşlem</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Kopya sayısı</b>
Initial denaturation	94 °C	10 dk	1
Denaturation	94 °C	15 sn	
Annealing	59 °C	30 sn	40
Extension	72 °C	25sn	
Final extension	72 °C	5 dk	1

### **3.2.10. Gen Ekspresyonu (İfadesi) Veri Analizi**

Her örnek için Ct (threshold cycles) eşik döngüsü belirlendi. GirazR geninin Stx1 ve Stx2 genleri için her örnekte ifade düzeyi ve Ct değerlerinin kullanımı hesaplandı. Real time PCR verilerinin analizinde istenilen genin ekspresyon düzeyi,  $\Delta Ct$  olarak da adlandırılan housekeeping genlere göre ölçüldü. Reaksiyon bittikten sonra cihazda oluşturulan ham reaksiyon ilerleme eğrisi, hesaplama tablosu ve standart eğriyi içeren değerlendirme verileri, cihazın yazılımı gereğince, delta delta ( $\Delta\Delta Ct$ ) olarak bilinen hesaplama yöntemi kullanılarak gen ifadesi veri analizleri yapıldı.

### **3.2.11. İstatistiksel Analiz**

Öncelikle, Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak verilerin normalliği açısından veri dağılımı kontrol edildi. Daha sonra iki veya daha fazla grup için hesaplanan bir değişkenin varyanslarının eşitliğini değerlendirmek amacıyla çıkarımsal bir istatistik olan Levene testi kullanıldı. Verileri analiz etmek ve ortalamalar arasındaki farkı bulmak için One-way ANOVA testi, çoklu karşılaştırmalar için Duncan çoklu aralık testi uygulandı. Veri analizi, SPSS versiyon 21.0 ve LinReg versiyon 11.0 yazılımı kullanılarak yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 *E. coli* O157:H7 Üretimi ve Antibiyogram Sonuçları

Sorbitol MacConkey Agar besiyerinde kültüre edilen *E. coli* O157:H7 sorbitol tüketiminin olmaması nedeniyle renksiz koloniler vermekte, *E. coli* ise pembe koloniler ile gözlemlenmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Sorbitol MacConkey Agar besiyerinde üreyen *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* kolonileri

*E. coli* O157:H7 suşu için tetrasikline karşı antibiyogram analizi antibiyogram disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında *E. coli* O157:H7 için elde edilen zon boyutları Tablo 4.1'de, antibiyogram görüntüsü ise Şekil 4.2'de verilmiştir.



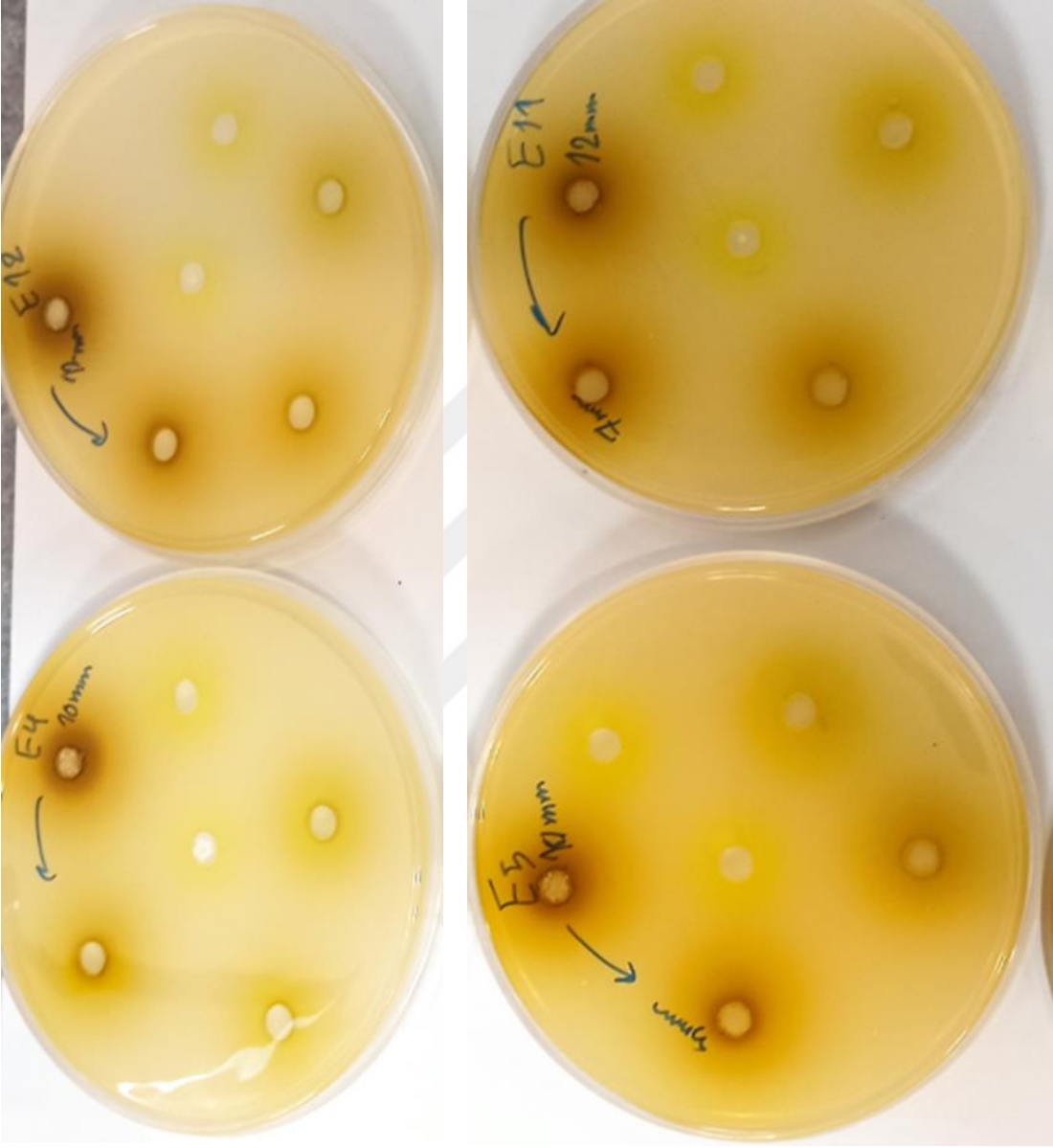
Şekil 4.2. Tetrasiklin disklerinin *E. coli* O157:H7 üzerindeki inhibisyon etkisi

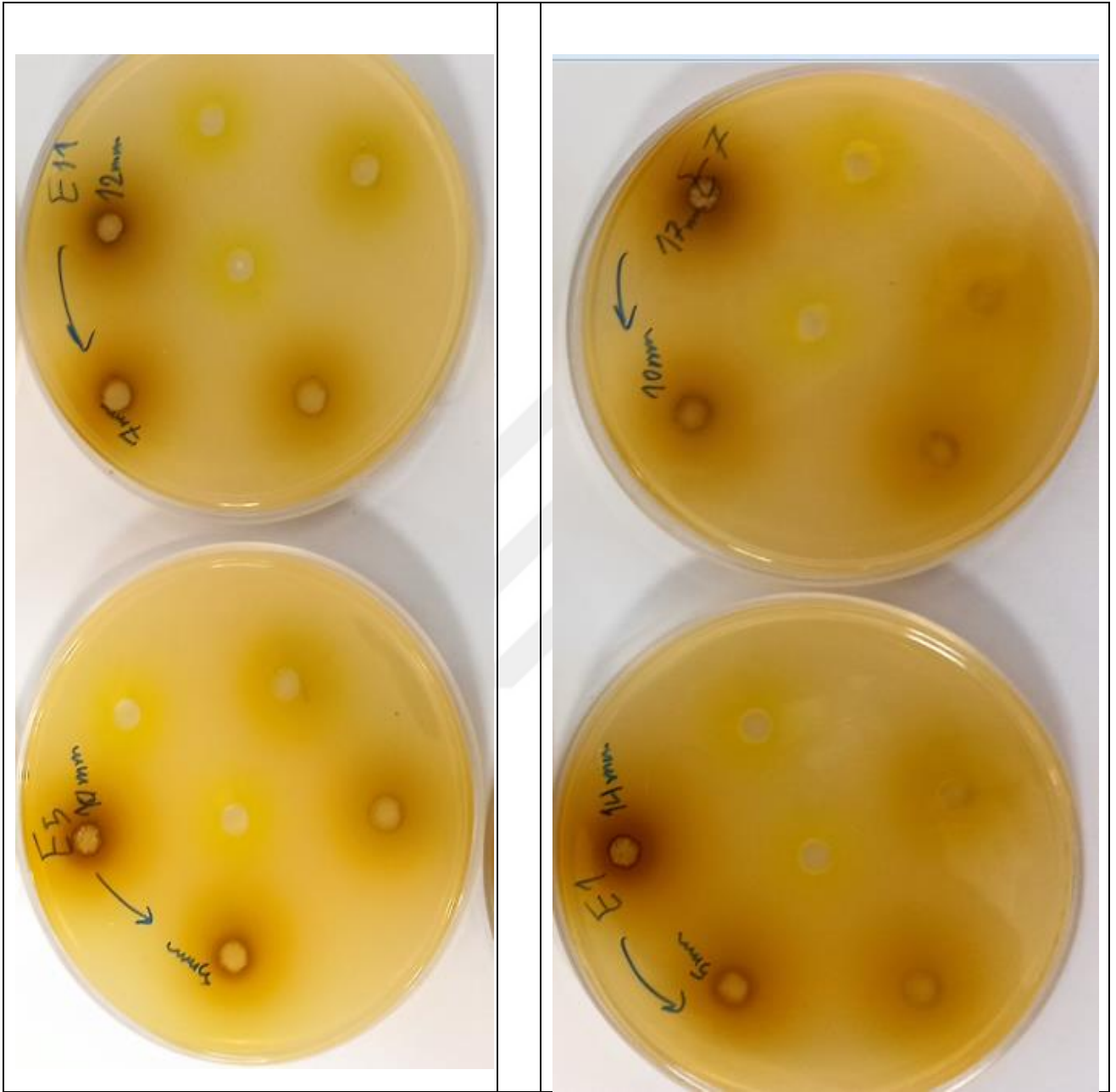
Tablo 4.1 Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında *E. coli* O157:H7 için zon boyutları

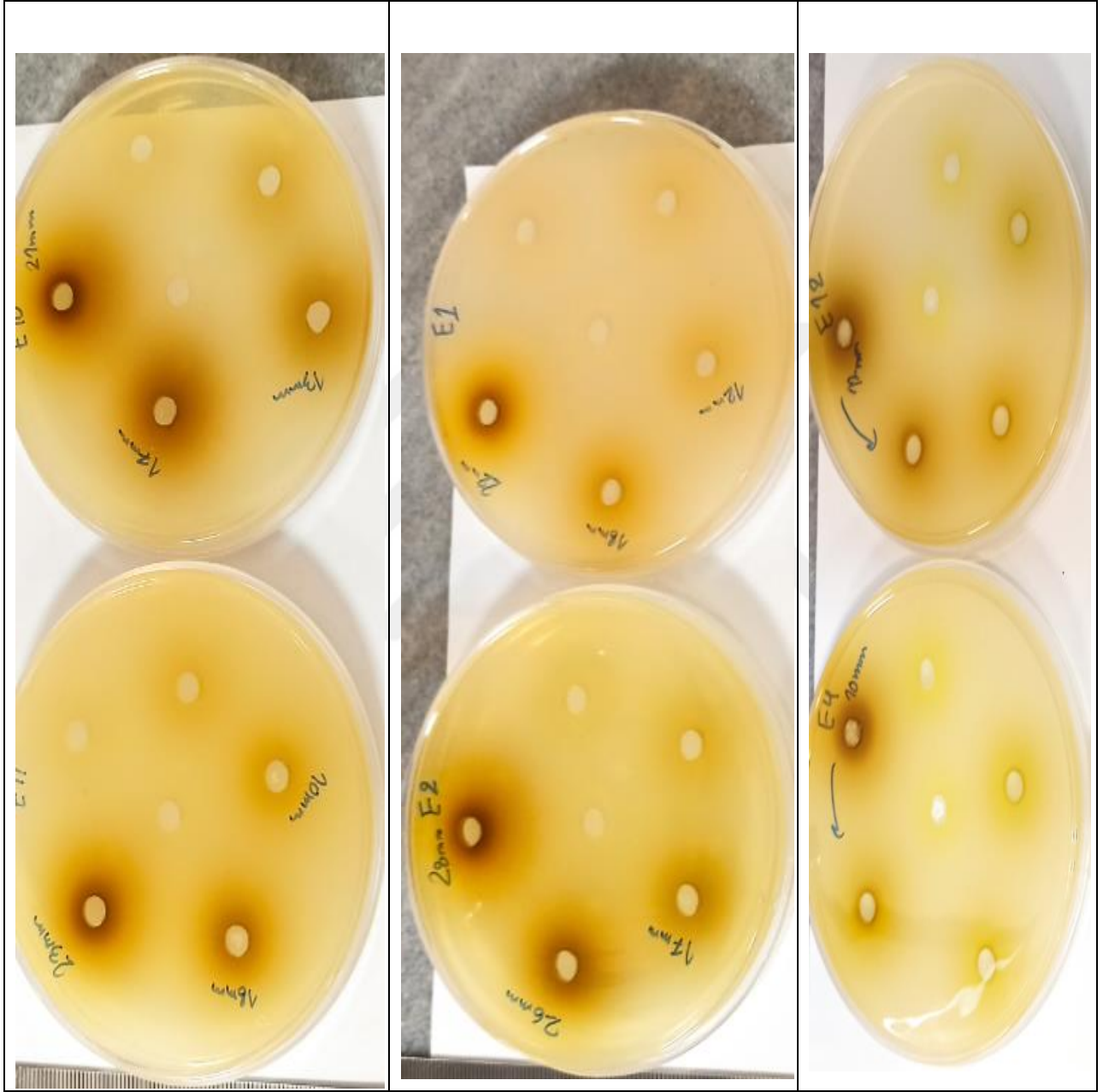
Tetrasiklin konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ )	Zon boyutu (mm)
0	0
20	7,2
40	10,3
80	13,1
100	14,4
200	20,1

#### 4.2 Kombu Çayı Ekstraktlarına ait İnhibisyon Testleri

Disk difüzyon yöntemi ile yapılan inhibisyon testlerinde disklere emdirilmiş farklı konsantrasyonlarda kombu çayı sulu ekstraktlarının *E. coli* O157:H7 üzerinde gösterdiği inhibisyon araştırıldı. En etkili inhibisyon konsantrasyonu 80 mg/ml olarak belirlendi. (Şekil 4.3)



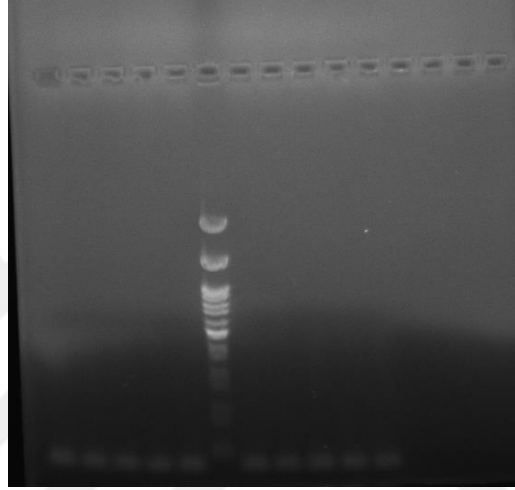




Şekil 4.3. Kombu çayı için inhibisyon konsantrasyonu belirlenmesi

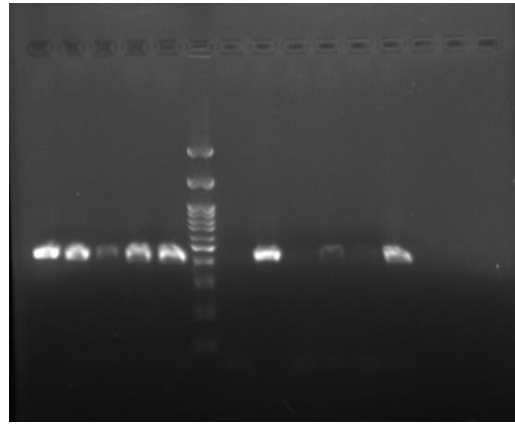
### 4.3 *E. coli* O157:H7 için Farklı Genlerin Mevcudiyetinin Belirlenmesi

Bu araştırmada incelenen *E. coli* O157:H7 suşunda PCR yontemi ile farklı genlerin varlığı araştırılmış, PCR sonrasında h ve F genlerinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Jel elektroforez sonucu şekil 4.4'de gosterilmiştir.



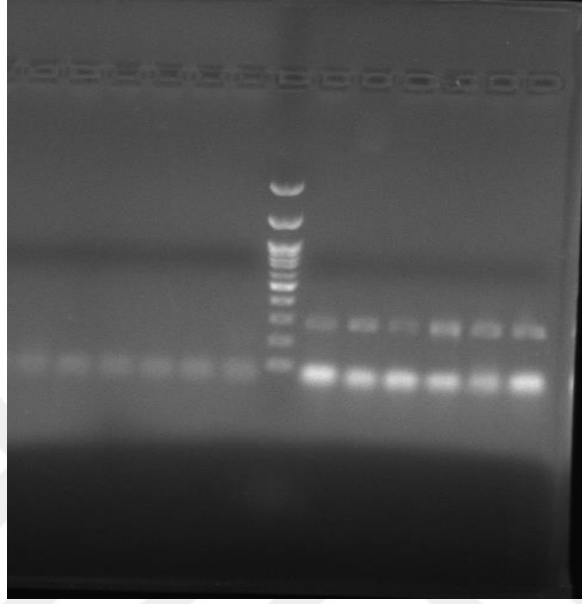
şekil 4.4. *E. coli* O157:H7 suşunda h ve F genlerinin yokluğu

Test edilen *E. coli* O157:H7 suşunda PCR yontemiyle B e dc geni tespit edilmiş ve 400 bp bandı olan %1,5 jel uzerinde yapılan elektroforez sonucu şekil 4.5'te gosterilmiştir.



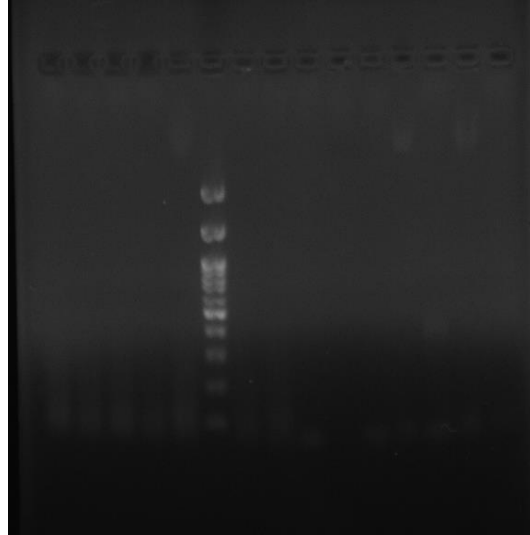
şekil 4.5. *E. coli* O157:H7 suşunda B e dc geninin varlığı

İncelenen sušta PCR yöntemiyle fhk geni bulunmazken, 300 bp aralığında ürün veren Aym geninin olduğu tespit edilmiş ve Şekil 4.6'da elektroforez sonucu gösterilmiştir.



**Şekil 4.6. *E. coli* O157:H7 suşunda Aym geninin varlığı, fhk genlerinin yokluğu**

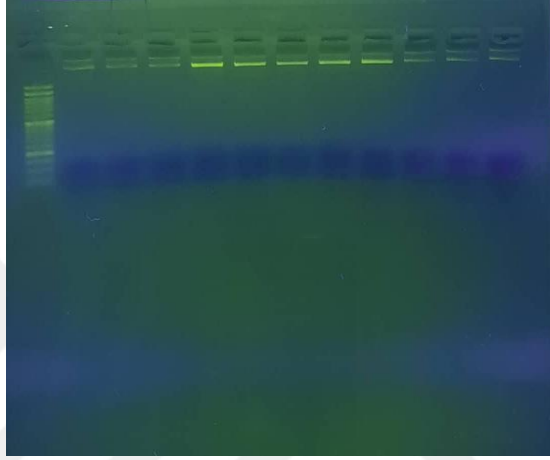
İncelenen *E.coli* O157:H7 suşunda PCR yöntemiyle G ve f geninin mevcut olmadığı saptanmış ve elektroforez sonucu Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.7. *E. coli* O157:H7 suşunda G ve f genlerinin yokluğu**

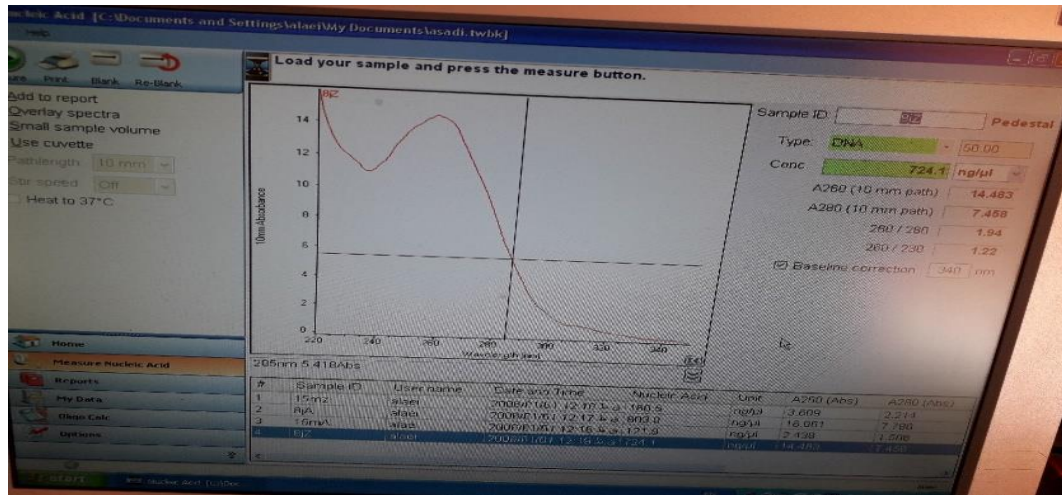
#### 4.4. DNA Kalitesi

DNA kalitesini kontrol etmek amacıyla örnekler jel üzerinde bahsedilen yöntemle elektroforeze tabi tutuldu. Şekil 4.8’de gösterildiği gibi, agaroz elektroforezinde DNA'nın keskin bandı gözlenmektedir.



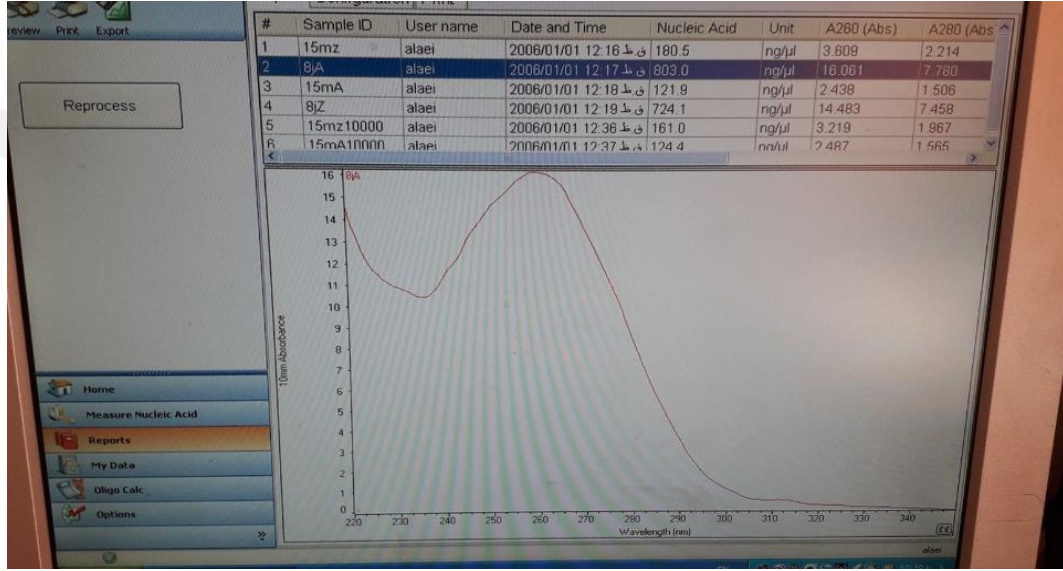
Şekil 4.8. Örneklerden ekstrakte edilen DNA'nın varlığı

**Ekstrakte edilen DNA'nın miktarının ve saflığının kontrolü:** Ekstrakte edilen DNA'nın miktarını ve saflığını kontrol etmek amacıyla örnekler Nanotel cihazı ile bahsedilen yöntem kullanılarak kontrol edildi. 260/280 nm’de yaklaşık 1,8-2 elde edildi Ekstrakte edilen DNA PCR ve Real-time PCR yöntemleriyle moleküler çalışma için kullanıldı.



Şekil 4.9. Ekstrakte edilen DNA'nın 260/280 nm dalga boyunda kalitesinin kontrol edilmesi

**Ekstrakte edilen RNA'nın miktarının belirlenmesi:** *E. coli* O157:H7'den ekstrakte edilen RNA'nın kantitatif değerlendirmesi, 260 ila 280 nm dalga boyunda nanodrop kullanılarak yapıldı.

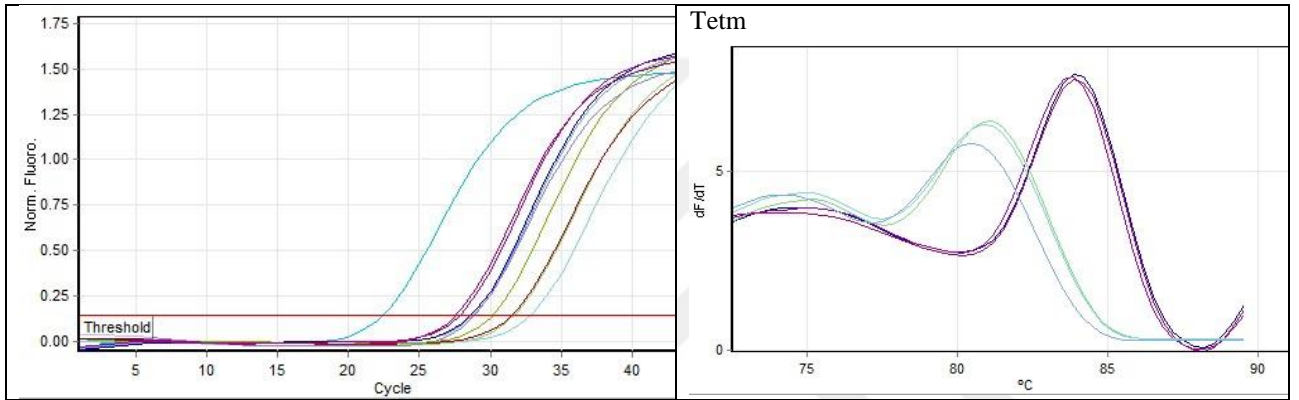


**Şekil 4.10. Ekstrakte edilen RNA'nın nitelik ve niceliğinin belirlenmesi**

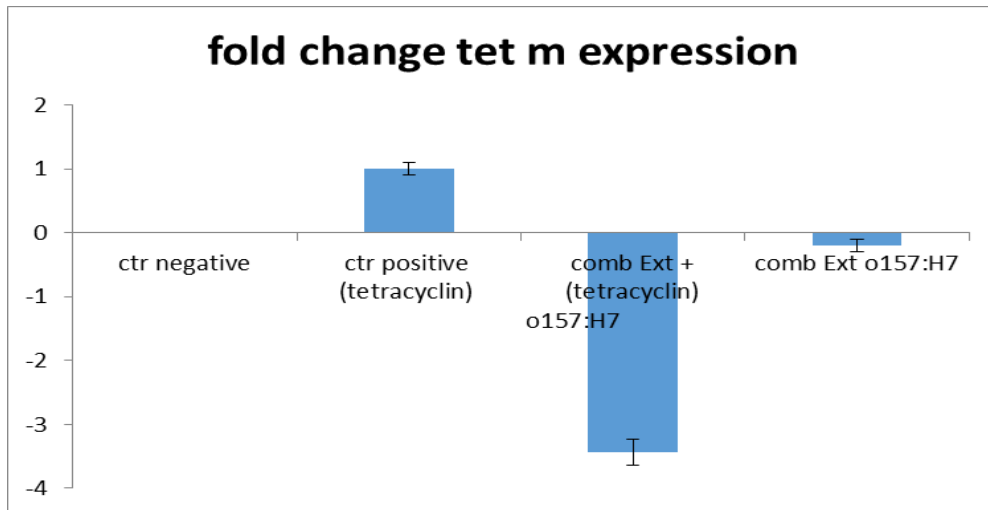
#### 4.5. Genlerin Ekspresyonu (İfadesi)

Her örnek için Ct (threshold cycles) eşik döngüsü belirlendi. GirazR geninin Stx1 ve Stx2 genleri için her örnekte ifade düzeyi ve Ct değerlerinin kullanımı hesaplandı. Real-time PCR verilerinin analizinde istenilen genin ekspresyon düzeyi,  $\Delta$ Ct olarak da adlandırılan housekeeping genlere göre ölçüldü. Reaksiyon bittikten sonra cihazda oluşturulan ham reaksiyon ilerleme eğrisi, hesaplama tablosu ve standart eğriyi içeren değerlendirme verileri, cihazın yazılımı gereğince, delta delta ( $\Delta\Delta$ Ct) olarak bilinen hesaplama yöntemi kullanılarak gen ifadesi veri analizleri yapıldı.

Kombu çayının *E. coli* O157:H7 suşu üzerindeki etkisi, tek başına Gyraz kontrol geni kullanılarak ve tetrasiklin ile kombinasyon halinde Real-time PCR tekniği ile tayin edildi. Sonuçlar, Kombu çayının Tetm geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu gösterdi ( $P<0.01$ ).

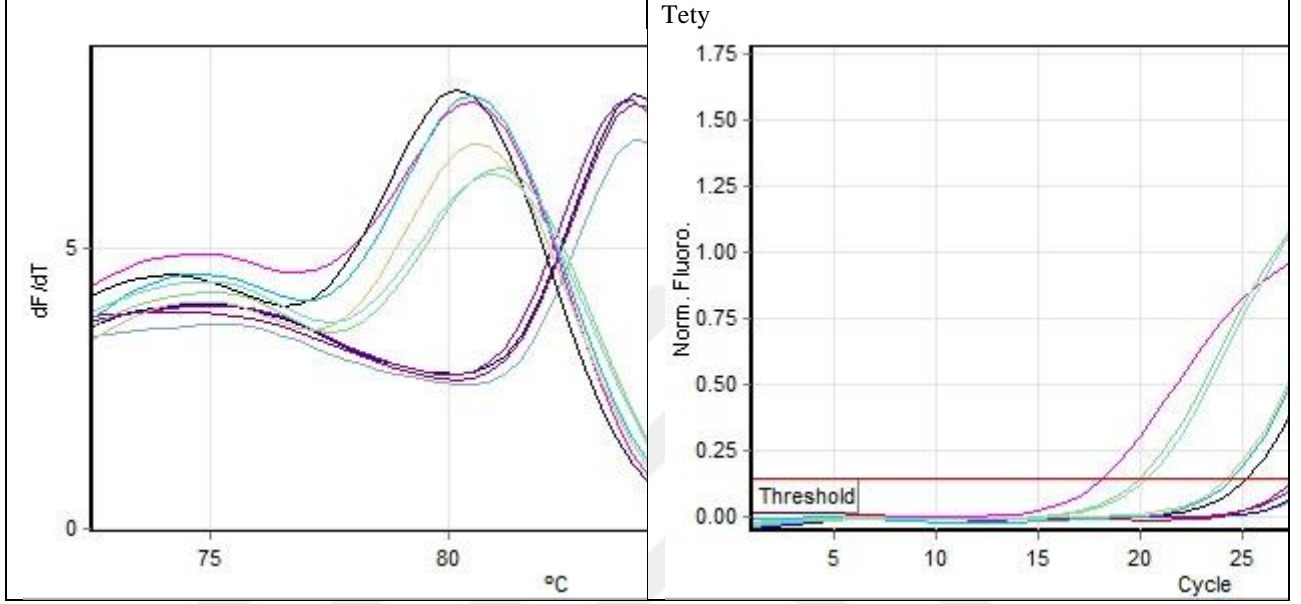


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	3.89	<0.01
Error	12	.51	

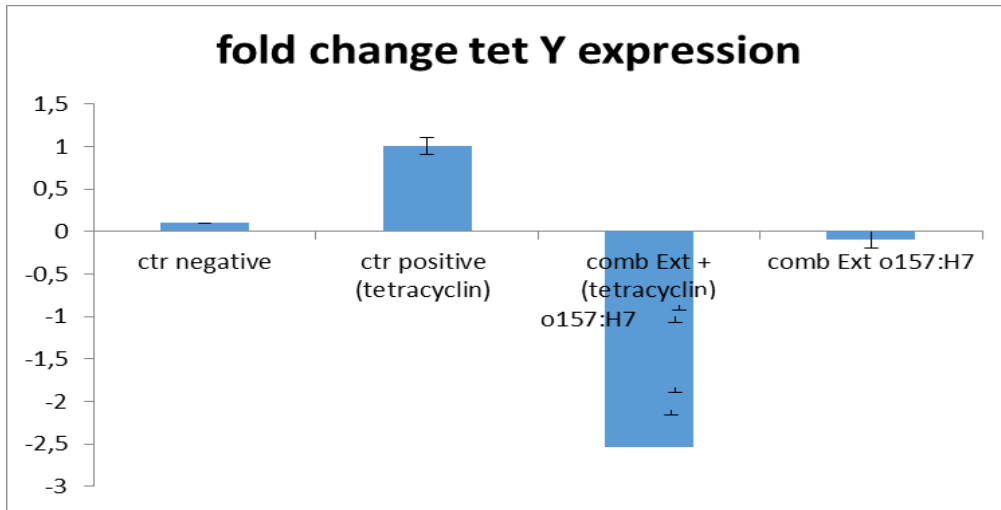


Şekil 4.11. Kombu çayının Tetm geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Tety geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edildi ( $P<0.01$ ).

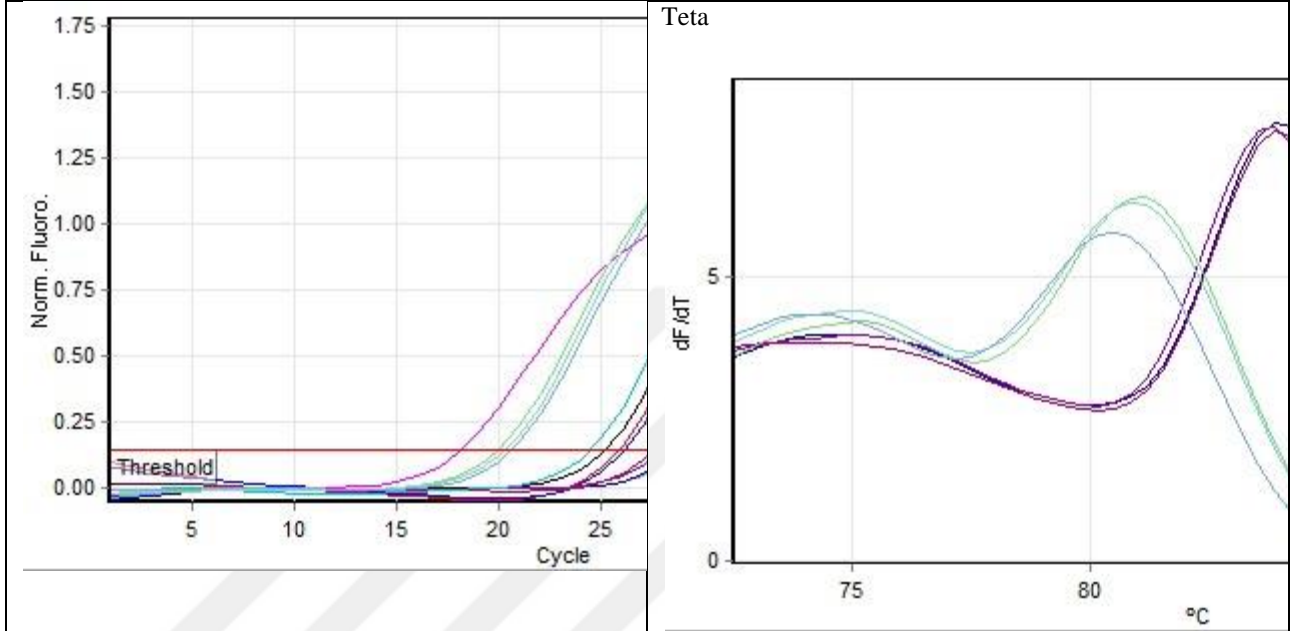


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	8.18	<0.01
Error	12	.23	

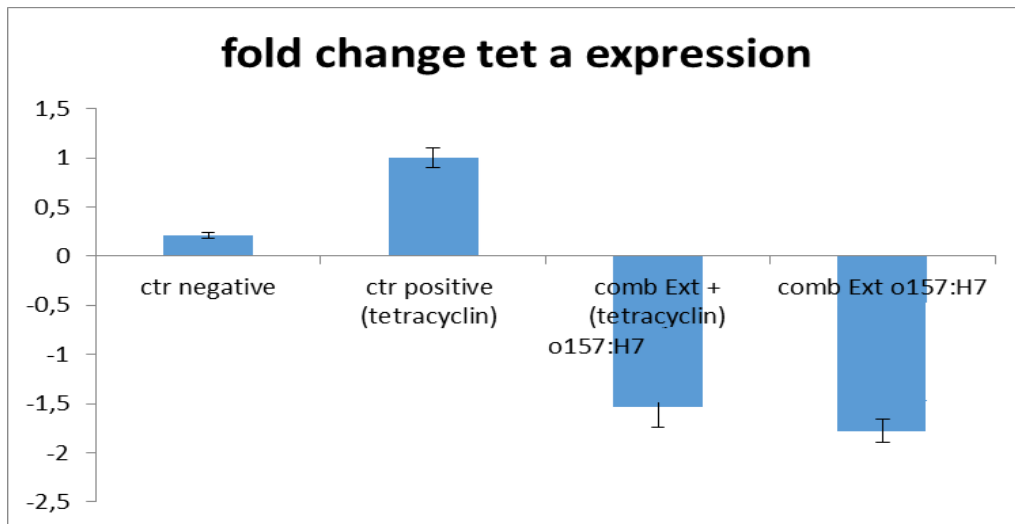


Şekil 4.12. Kombu çayının Tety geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Teta geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edildi ( $P<0.01$ ).

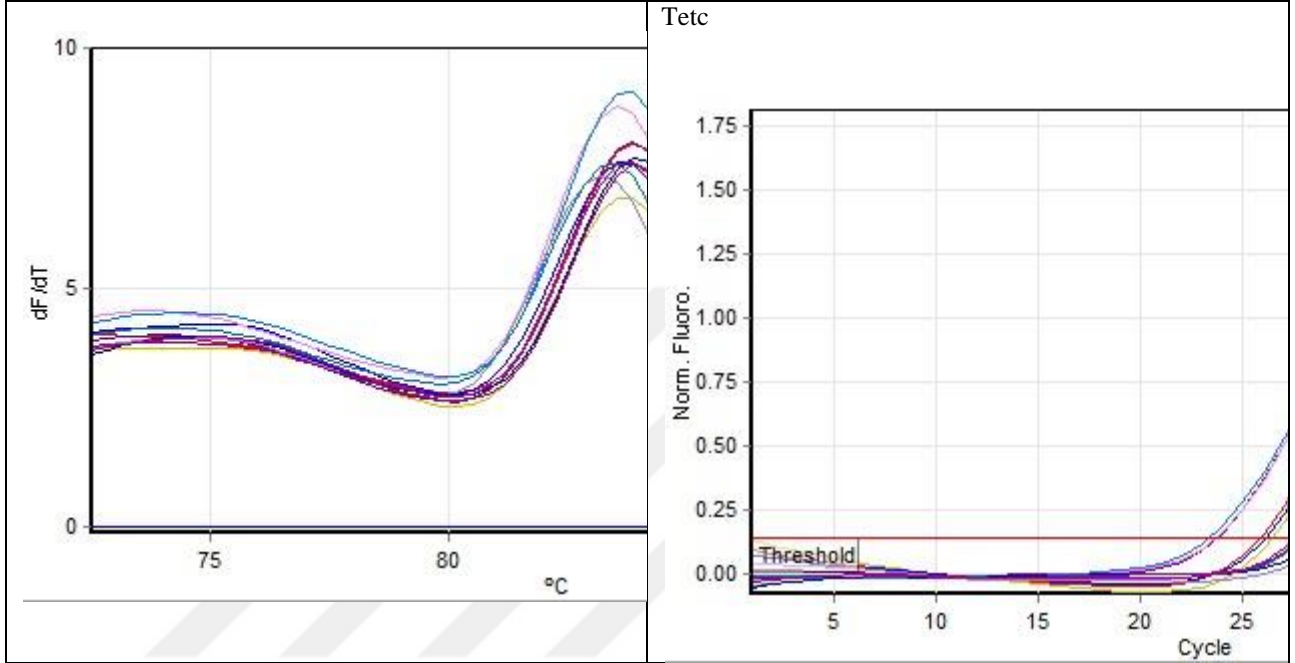


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	6.09	<0.01
Error	12	.23	

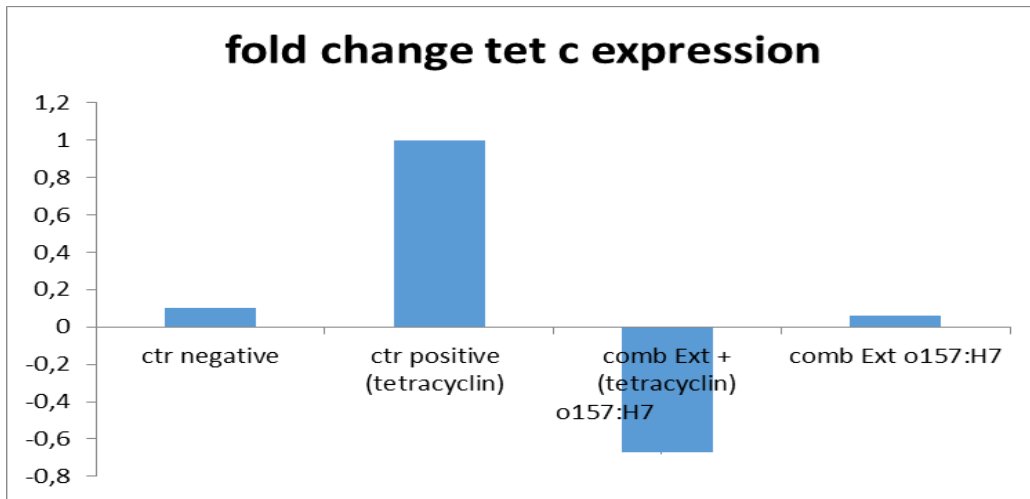


Şekil 4.13. Kombu çayının Teta geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Tetc geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edildi ( $P<0.01$ ).

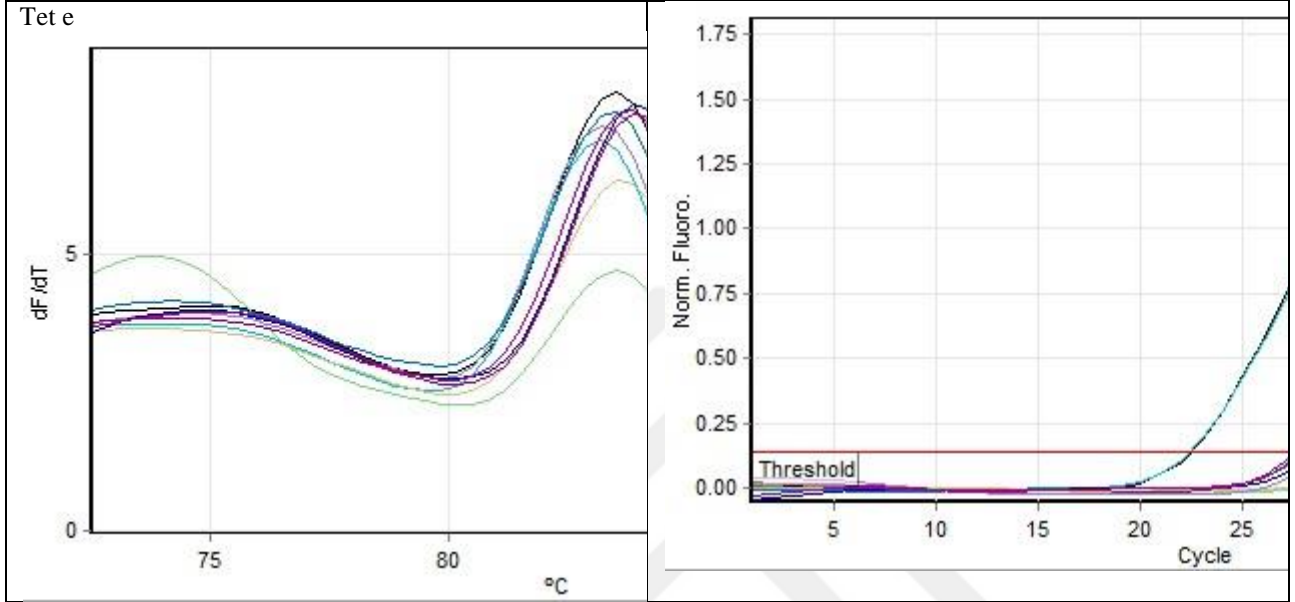


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	2.81	<0.01
Error	12	.09	

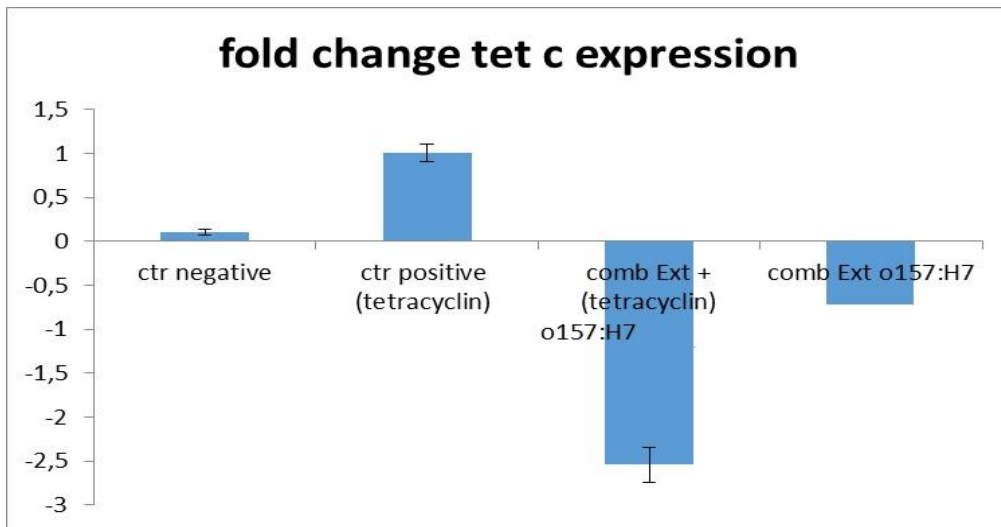


Şekil 4.14. Kombu çayının Tetc geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Tete geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edildi ( $P<0.01$ ).

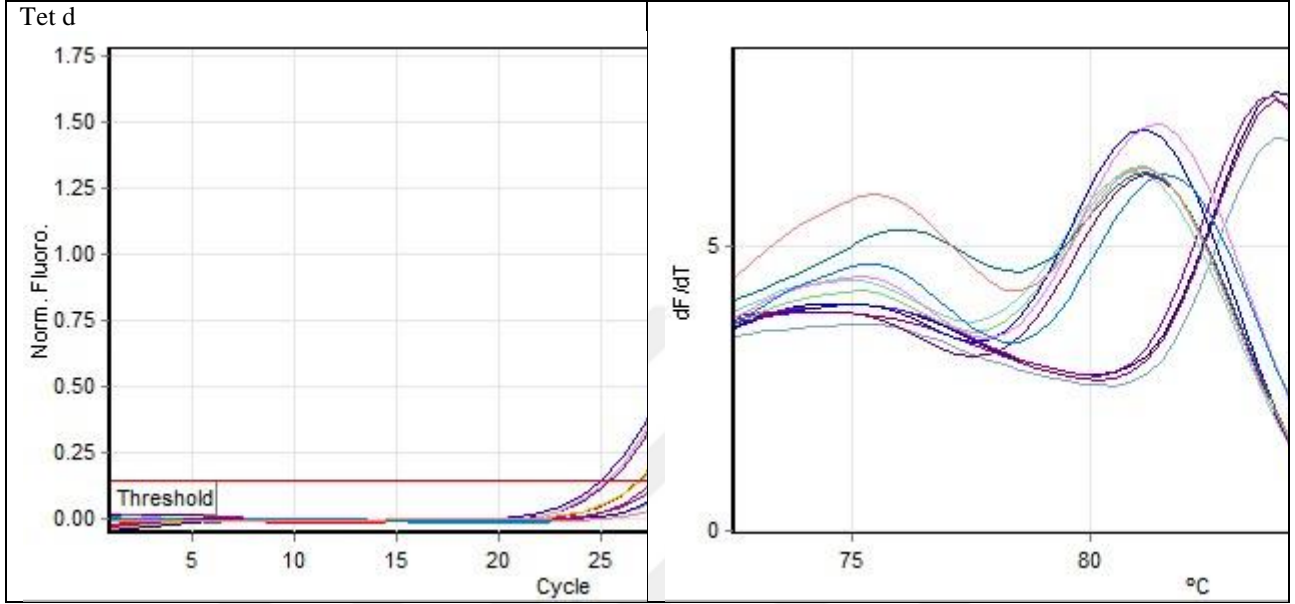


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	7.79	<0.01
Error	12	.31	

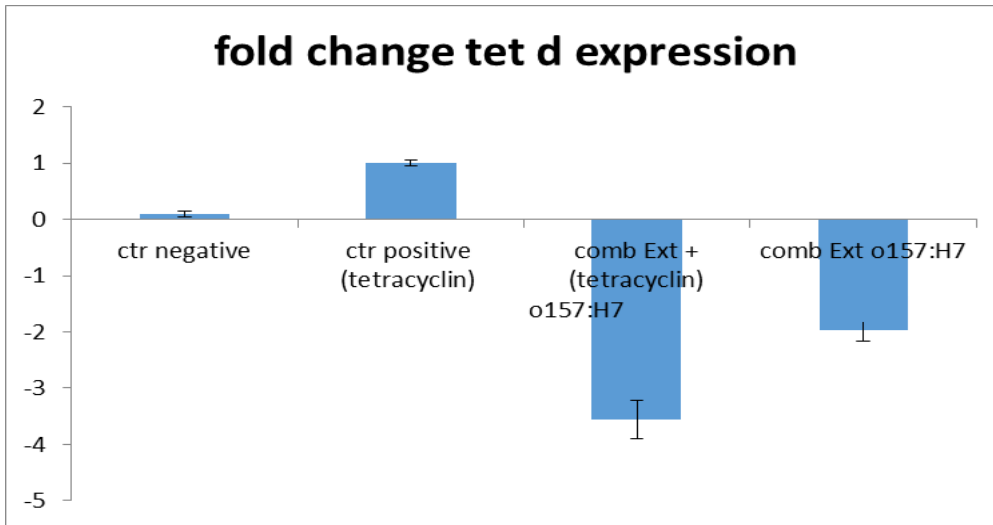


Şekil 4.15. Kombu çayının Tete geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Tetd geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edildi ( $P<0.01$ ).

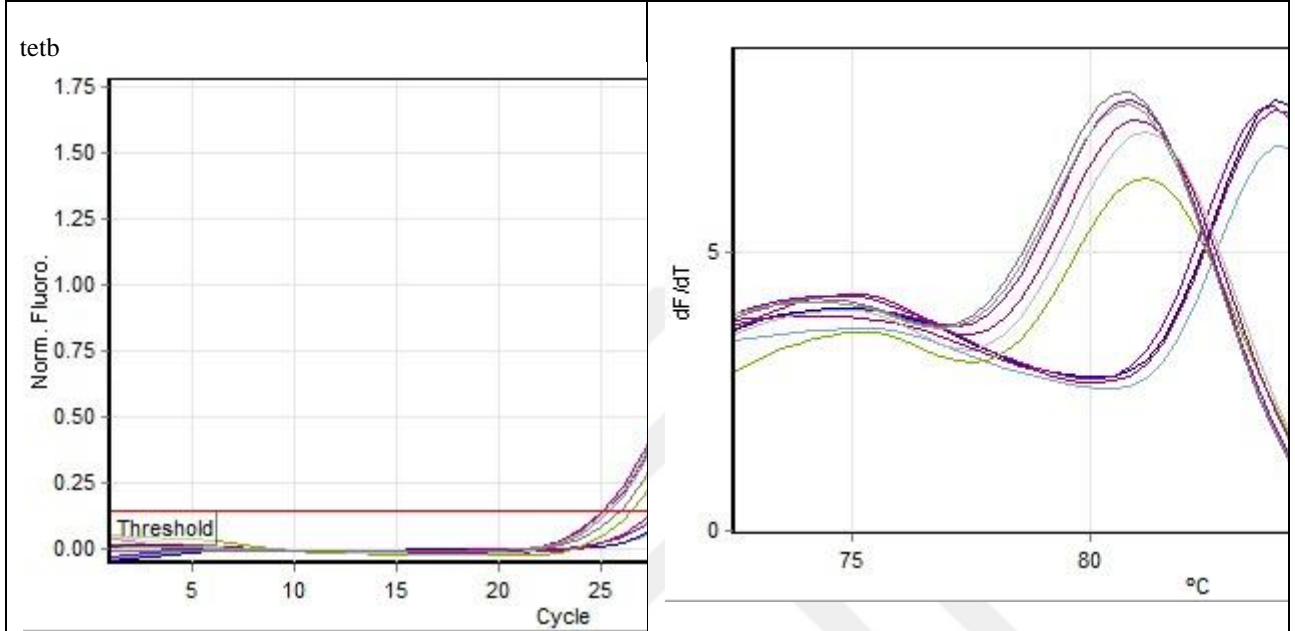


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	1.06	<0.01
Error	12	.11	

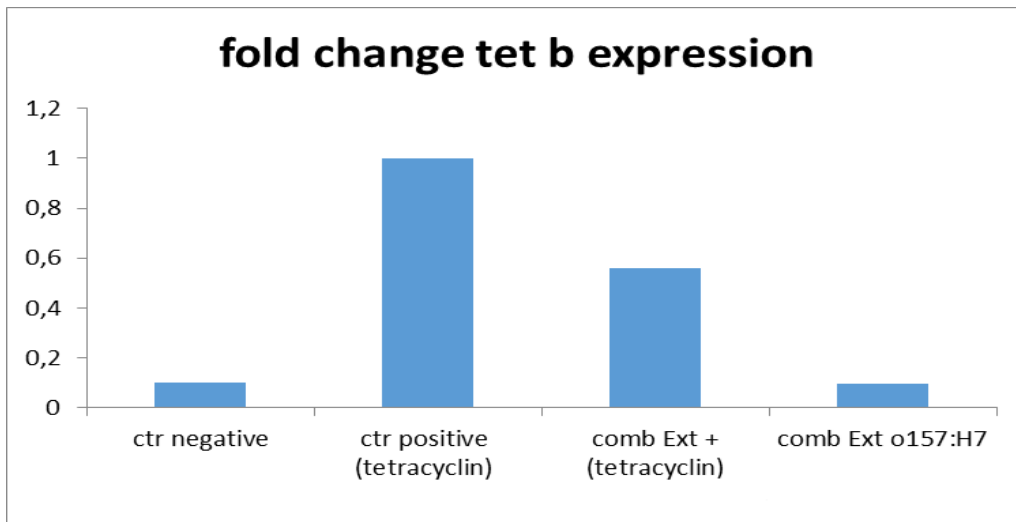


Şekil 4.16. Kombu çayının Tetd geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Tetb geni üzerinde azaltıcı bir etkisinin olmadığı tespit edildi ( $P<0.1$ ).

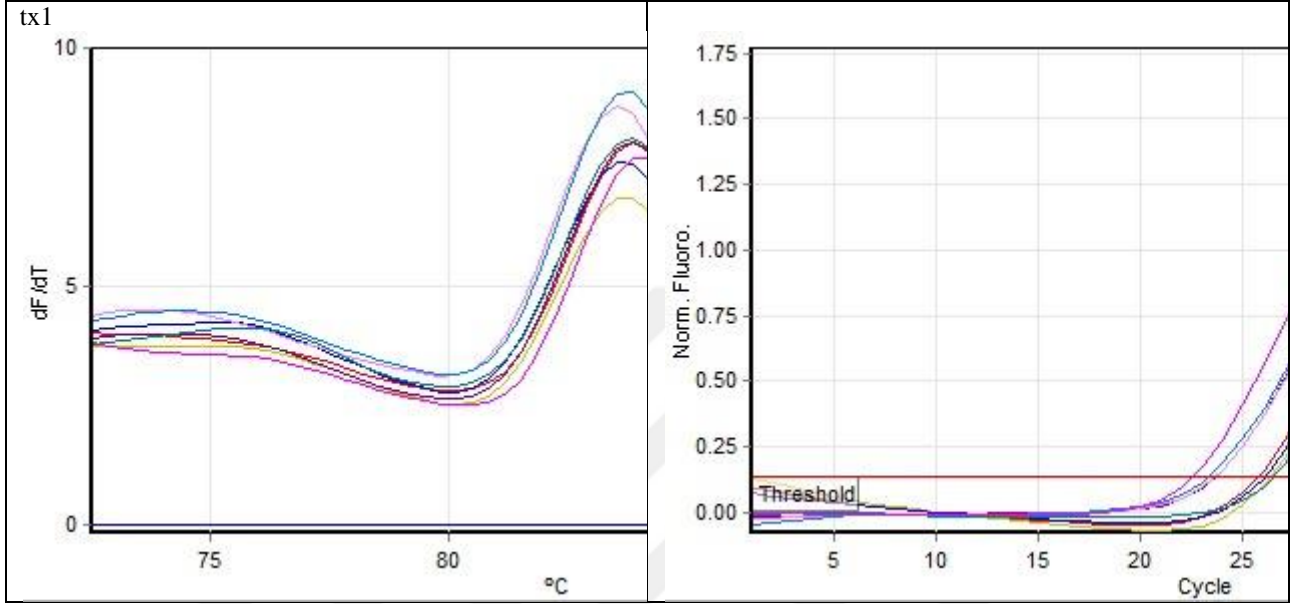


Sov	Df	Ms	Sig
Treatment	3	1.34	<0.1
Error	12	.06	



Şekil 4.17. Kombu çayının Tetb geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Stx1 geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olmadığı tespit edildi ( $P < 0.1$ ).

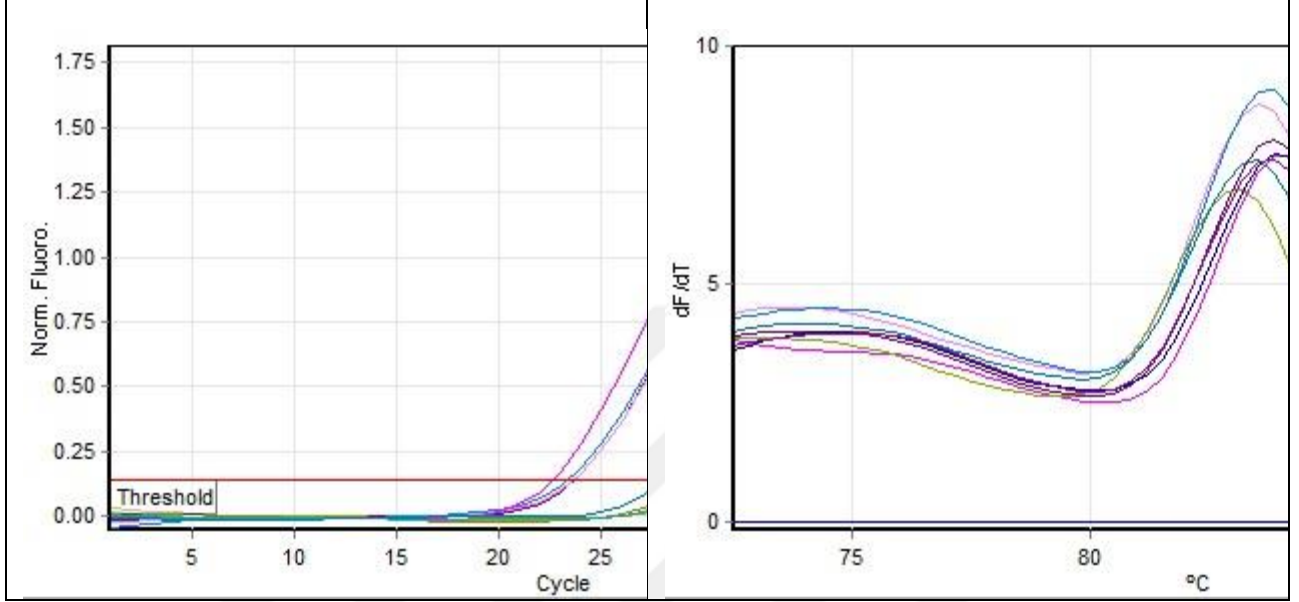


Sov	Df	ms	P value
Treatment	4	4.23	< 0.1
Error	10	2.11	

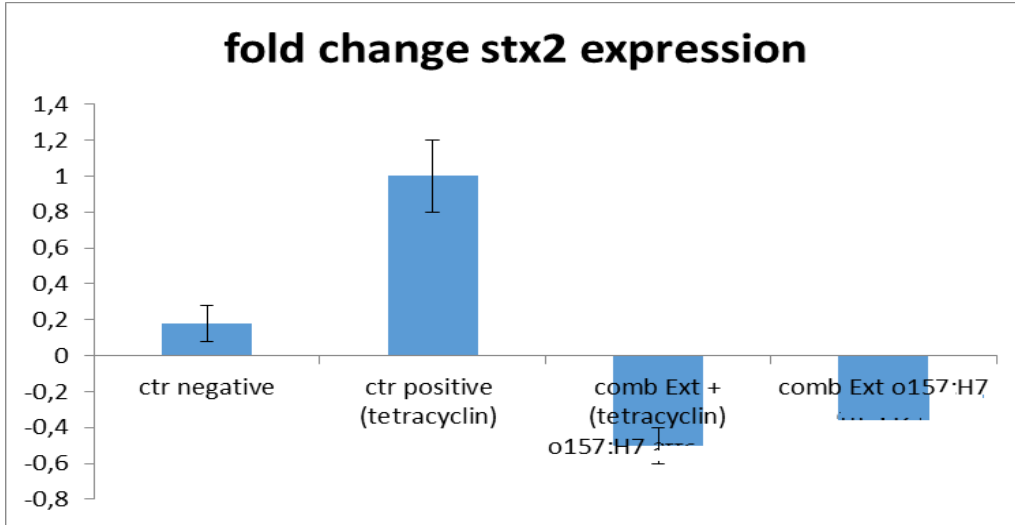


Şekil 4.18. Kombu çayının Stx1 geni üzerindeki etkisi

Kombu çayının Stx2 geni üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edildi ( $P<0.01$ ).).  
Bu gen, bu organizmanın klinik belirtilerdeki virülans göstergelerinden biridir.



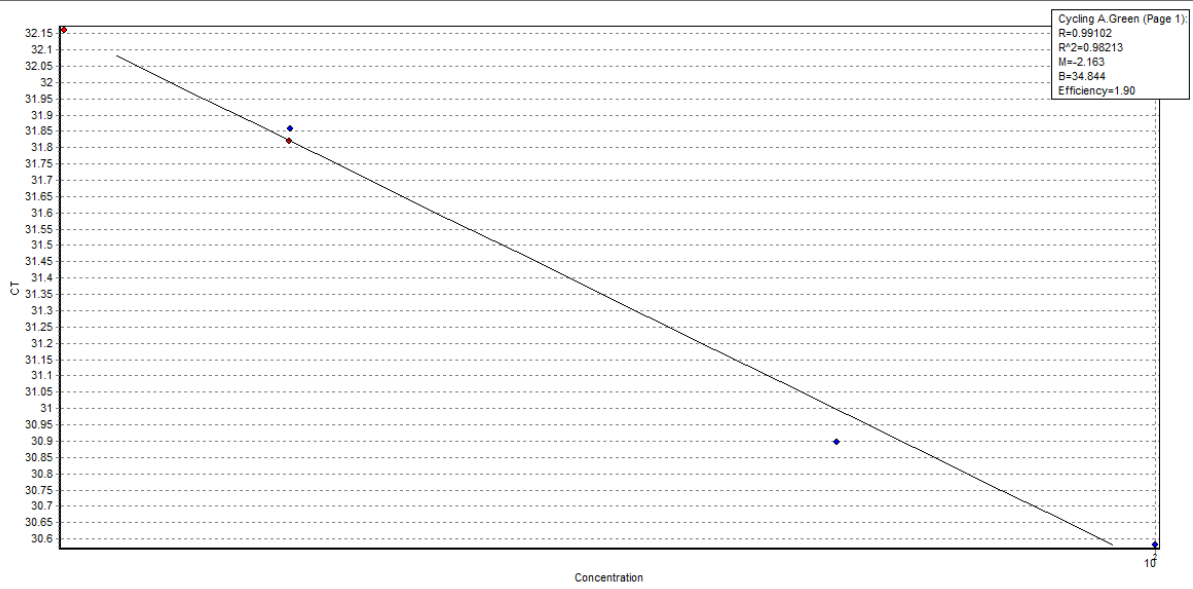
Sov	Df	Ms	P value
Treatment	4	13,56	<0.01
Error	10	1.76	



Şekil 4.19. Kombu çayının Stx2 geni üzerindeki etkisi

#### 4.6. Primerlerin Etkinliğinin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan primerlerin etkinliğinin belirlenmesi için etkinlik testi yapıldı. Sonuçlar testin verimliliğinin %98 olduğunu gösterdi. Primerler, Şekil 4.20'de gösterildiği gibi PCR aşamasında %98 verimli olarak bulundu.



Şekil 4.20. Çalışmada kullanılan primerlerin etkinliğinin belirlenmesi

## 5. TARTIŞMA

İnsanlığın karşı karşıya olduğu zorluklardan biri, patojenlerin mutasyon sonucunda çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesidir (Afshar ve diğ., 2021). *E. coli* türleri de dahil birçok bakteri türünde, zamanla çeşitli antibiyotiklere direnç oluşturan farklı genler ortaya çıkabilmekte ve bakteriler antibiyotiklere dirençli hale gelebilmektedir (Soltani ve diğ., 2007). Antimikrobiyal ajanlar, bulaşıcı hastalıkların azaltılmasında ve tedavisinde oldukça etkili olsalar da, çeşitli patojenlerin antibiyotiklere karşı direncinin artması, alternatif antimikrobiyal yöntemlere ve eski geleneksel ilaçlara yönelime neden olmuştur (Aarestrup ve diğ., 2000; Marsh ve diğ., 2014).

Kombucha, mantar ve bakterilerden oluşan bir ortam olup, aralarında *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Lactobacillus* türlerinin de bulunduğu bir grup faydalı maya ve bakteriyi içeren bir polisakkarit tabakasıdır. Kullanımı geleneksel Çin tıbbına dayanan Kombucha ile tatlı bir tada ve uygun asitliğe sahip Kombu çayı olarak adlandırılan fermente bir içecek üretilmektedir (Bhattacharya ve diğ., 2016; Reva ve diğ., 2015). Marsh ve diğ., (2014) tarafından Kombucha'nın içerdiği toplam bakteri popülasyonunun %85'ini *Gluconobacterium* türlerinin oluşturduğu ve Laktobasillerin de büyük oranda bulunduğu, mevcut mayaların %95'inden fazlasının *Zygosaccharomyces* olduğu rapor edilmiştir.

Kombu çayının probiyotik özellikleri, çok çeşitli faydalı bağırsak mikroorganizmalarının varlığından kaynaklanmaktadır. Bu çayın bileşiminde, bağışıklık sistemini güçlendirmede ve birçok biyolojik fonksiyonda etkili olan B12, folik asit, K vitamini gibi vitaminler, fosfor, metionin ve antioksidan özelliğe sahip bileşikler bulunmaktadır. Aynı zamanda anti-diyabetik ve anti-kanserojenik özelliklere sahip olduğu da öne sürülen Kombu çayının, sindirim fonksiyonunun iyileştirilmesinde de etkili bir role sahip olduğu iddia edilmektedir (Eroğlu ve diğ., 2023; Rajaei ve diğ., 2021; Zendeboodi ve diğ., 2020).

Kombu çayının çeşitli mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu özellikle, *Pseudomonas aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve *Enterococcus faecalis* gibi geniş bir pH aralığında üreyebilen, gıda zehirlenmelerine ve çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilen farklı Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerine de antibakteriyel etkisi olduğu öne sürülmektedir (Bhattacharya ve diğ., 2018). Bu nedenle, çalışmamızda gıda kaynaklı zehirlenmelerin nedenlerinden biri olan *E. coli* O157:H7 suşu üzerine Kombu çayının antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. *E. coli* O157:H7, Shiga nörotoksinine benzerliğinden dolayı Shiga benzeri toksin olarak adlandırılan verotoksin salgılar. Vero toksinler, protein sentezini engelleyen STX1 ve STX2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Vakalarda, normal ishal şeklinde başlayıp sonrasında ciddi mide kramplarının görüldüğü kanamalı ishale dönen, hemorajik kolit tablosu görülebilir. Hastalık bazen daha da ilerleyerek hemolitik üremik sendrom (HUS) veya trombotik trombositopenik purpura (TTP) gibi hayatı tehdit eden rahatsızlıklara da sebep olabilmektedir (Sittipo ve diğ., 2019; Shahbazi ve diğ., 2023)

Kombu çayının *E. coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, Kombu çayının sulu ekstraktının bu bakteri üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu belirlenmiş ve bu etkiyi açıklayabilmek amacıyla, bakterinin hedef genlerinin ekspresyonu Real time PCR tekniği ile araştırılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, tek başına Kombu çayının, ya da Kombu çayı ve tetrasiklinin eş zamanlı varlığının, Teta, Tete, Tetd genlerinin ekspresyonunu azalttığı ve bu azalma etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P<0.01$ ) saptanmıştır.

Ayrıca, Kombu çayının ve tetrasiklinin eş zamanlı varlığının, Tetm, Tetc, Tety gen ekspresyonunu azalttığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P<0.01$ ) bulunmuştur. Bunların yanı sıra, tek başına Kombu çayı varlığının ve Kombu çayı ile tetrasiklin birlikteliğinin, *E. coli* O157:H7'nin klinik belirtilerdeki virülans göstergelerinden biri olan Stx2 gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P<0.01$ ), ancak Stx1 gen ekspresyonunun azaltılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği ( $P<0.1$ ) tespit edilmiştir.

Kombu çayı ekstraktı ya da ekstrakt ve tetrasiklinin eş zamanlı varlığı, her ne kadar Tetb gen ekspresyonunun azalması üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermese de, konu ile ilgili kesin sonuçların elde edilmesi açısından daha fazla araştırmanın yapılması gerekmektedir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, Kombü çayı ekstraktının gerek tek başına gerekse tetrasiklin ile birlikte *E. coli* O157:H7'nin gelişimini ve çoğalmasını engelleyebileceği ve gen ekspresyonunu azaltabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, tetrasiklinin tek başına bu bakteriyi inhibe edemediği ve incelenen genlerin gen ekspresyonunu azaltamadığı saptanmıştır. Bu durum, *E. coli* O157:H7 suşunun tetrasikline dirençli hale geldiğini göstermektedir. Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen bulguların tamamlayıcı tıp alanında değerli olduğu düşünülmektedir.

Kombü çayının mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyel etkilerin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Batikh ve diğ. (2012), yaptıkları çalışmada, Kombü çayı hazırlanmasında siyah çay ile iki şifalı bitkinin kombinasyonunu kullanmışlardır. Antibakteriyel ve antifungal aktivite değerlendirildikten sonra tatmin edici sonuçlar gözlemlendiği ve Kombü çayının antibakteriyel etkisinin yalnızca asetik asit ve diğer organik asitlerin neden olduğu asitlikten kaynaklanmadığı, daha ziyade proteinler, antibiyotikler, enzimler ve diğer biyosentez ürünleri gibi biyolojik bileşiklerin varlığından kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Kombü ile fermente edilmiş soya fasulyesi proteininin antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bu içecek ile asetik asidin *S. aureus*, *E. coli* ve *Bacillus subtilis* üzerindeki inhibitör etkisi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, fermente edilmiş soyanın kombü ile kombinasyonunun bakteriler üzerine inhibe edici etkisinin daha yüksek olduğu ve üretilen asetik asidin tek başına antibakteriyel aktiviteden sorumlu olmadığı belirtilmiştir (Tu ve diğ., 2019).

Mizuta ve diğ. tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada, Kombü çayının *Alicyclobacillus* spp. üzerine antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, Kombü ile fermente edilen yeşil çaydan elde edilen ekstraktın aktivitesi test edilmiş ve minimum inhibitör konsantrasyonun ve antibakteriyel konsantrasyonun %12,5 ila %50 aralığında gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Coelho ve diğ. (2022) tarafından Minas Frescal peynirinin üretiminde Kombü'nün *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla, deneysel olarak kontamine edilerek üretilen peynirlere Kombü eklenmesiyle asitlik derecesi, toplam bakteri sayısı, maya, koliform, laktobasil sayılarında ve sertlik ile yapışkanlık değerlerinde önemli değişiklikler gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Vohra ve diğ. (2019) tarafından Malezya'da yapılan bir çalışmada, fermantasyon süresindeki değişikliklerin Kombü çayının antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmış, yeşil çay ile hazırlanan Kombü çayının disk difüzyon yöntemini kullanarak yapılan antimikrobiyal aktivite değerlendirilmesinde; bu çayın *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *S. marcescens*'e karşı iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın aksine, Brezilya'da 2022 yılında siyah ve yeşil Kombü çayının antibakteriyel aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, siyah ve yeşil Kombü çayının, *S. aureus*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermediği belirtilmiştir (Barbosa ve diğ., 2022).

Bassyouni ve diğ. (2023) tarafından Mısır'da yapılan başka bir çalışmada, Kombü çayının vorikonazol ile kombine edilmesinin klinik izolatların vulvovajinal kandidiyazise karşı antifungal aktivitesi incelenmiştir. Araştırmada, 89 suş izole edilmiş ve 60 izolatın değişken direnç gösterdiği (57 izolat vorikonazole dirençli iken 3'ünde doza bağlı duyarlılık olduğu) belirlenmiştir. Kombü çayı, vorikonazolün MIC50 değerini tüm suşlara karşı 5'ten 0,625 µg/mL'ye ( $P<0,01$ ) önemli ölçüde azaltırken, MIC90 değerinin 10'dan 1,25 µg/mL'ye düştüğü, 0,156 µg/mL konsantrasyonundaki vorikonazolün tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında, Kombü çayı süpernatantının eklenmesinden sonra 18 suşun oluşturduğu biyofilmleri yok etmede başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Mısır'da yapılan bir diğ. çalışmada, Kombü çayı ekstraktı ile çinko oksit nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi araştırılmış, bu kombinasyonunun antibiyotik kullanmak yerine bakteriyel direnç sorunlarının üstesinden gelmede umut verici bir geleceğe sahip olduğu bildirilmiştir (El-Fallal ve diğ., 2023).

Brewer ve diğ.'nin 2021 yılında ABD'de yaptıkları bir çalışmada, ev yapımı Kombü çayı fermantasyonu sırasında yerel mikrobiyotadaki değişiklikler ile *E. coli* ve *Salmonella*'nın hayatta kalma süresi araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, bu bakterilerin canlılığının, evsel ortamlarda kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen Kombü çeşitlerindeki doğal farklılıklara bağlı olduğunu göstermiştir. Bakteri kontaminasyonunu önlemek ve Kombü çayı tüketiminden kaynaklanabilecek hastalık riskini azaltmak için özellikle ev ortamında hazırlanan çaylarda hijyen önlemlerine dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Kombu çayının baldaki antibakteriyel etkisini araştıran bir araştırmada, balda 1:5 oranında hazırlanan kombinasyonunun bazı mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel etkisi test edilmiştir. *Pseudomonas aerogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Enterococcus faecalis* üzerine 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 mg/ml olmak üzere 8 farklı konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. Bu araştırmada antibakteriyel etkinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar Gram pozitif ve negatif bakteriler arasında en fazla antibakteriyel etkinin sırasıyla 128 ve 256 mg/ml'lik konsantrasyonlarda *Enterococcus faecalis* ve *E. coli* üzerinde olduğunu göstermiştir. Öldürücü etkinin de artan konsantrasyonla orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (Soltani ve diğ., 2020).

Akarca (2021) tarafından yılında yapılan bir çalışmada, böğürtlen, ahududu gibi bazı kırmızı meyveler ile üretilen Kombu çayının fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri ile antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmıştır. Fermantasyon sonunda örneklerde en çok potasyum ve magnezyum tespit edilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde kateşin ve gallik asit saptanmıştır. Böğürtlenle üretilen örnekler tüm kriterlerde en çok beğenilenler olmuş, böğürtlen içeren örneklerde en yüksek antibakteriyel ve antifungal etki *S. aureus* ve *Rhizopus nigricans* üzerinde (zon çapı 24,36 ve 20,53 mm) tespit edilmiştir.

Siyah ve yeşil çaydan yapılan kombu çayının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, geleneksel Kombucha kültürüyle yeşil ve siyah çay demlenerek fermente edilen Kombu çayının, bazı patojen bakteriler ve klinik *Candida* türlerine karşı antibakteriyel/antifungal aktiviteleri agar difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Araştırma sonuçları, her iki Kombu çayında da antimikrobiyal potansiyel olduğunu göstermiş, yeşil çay ile fermente edilerek üretilen Kombu çayının en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sonuçlara göre, *Staphylococcus epidermidis* (22 mm), *Listeria monocytogenes* (22 mm) ve *Micrococcus luteus* (21,5 mm) geniş inhibisyon bölgeleri göstermiş, bunun yanı sıra, Kombu yeşil çayının *Candida parapsilosis*'e karşı gösterdiği antifungal etki önemli bulunmuştur (Battikh ve diğ., 2013).

Sreeramulu ve diğ. (2000) tarafından yapılan bir araştırmada ise, fermantasyonda sakkarozlu (%10 w/v) ay suyu içinde ek olarak bir starter kültür kullanılarak hazırlanan Kombu ayının antimikrobiyal aktivitesi bir dizi patojenik mikroorganizmaya karşı araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, *S. aureus*, *Shigella sonae*, *E. coli*, *Aeromonas Hydrophila*, *Yersinia enterolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloaca*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*'in Kombu ayına duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Kombu ayında oluşan yüksek miktarda asetik asitin bu inhibitör etkiden sorumlu olabileceği ancak, asetik asit ve proteinler dışında antimikrobiyal bileşiklerin de Kombu ayında varlığına işaret etmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kombu ayı çeşitli organik asitleri, polifenolleri ve laktik asit bakterilerini içermesi nedeniyle doğal bir antimikrobiyal kaynak olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle son yıllarda kombu ayının özellikleri ve etkileri geniş çapta araştırılmaktadır. Kombu ayının *E. coli* O157:H7 zerine antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bu çalışmanın sonuçları, Kombu ayının sulu ekstraktının bakteri üzerinde önemli bir inhibitör etkisi olduğunu göstermiş ve bu organizmanın klinik belirtilerdeki virülans göstergelerinden biri olan Stx2 gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir azaltıcı etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Ayrıca, tek başına Kombu ayının, ya da Kombu ayı ve tetrasiklinin eş zamanlı varlığının, Teta, Tete, Teta genlerinin ekspresyonunu azalttığı ve bu azalma etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Kombu ayının ve tetrasiklinin eş zamanlı varlığının, Tetm, Tetc, Tety gen ekspresyonunu azalttığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.

Kombu ayı ekstraktı ya da ekstrakt ve tetrasiklinin eş zamanlı varlığı, her ne kadar Tetb gen ekspresyonunun azalması üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermese de, bu durum konu ile ilgili kesin sonuçların elde edilmesi açısından daha fazla araştırmanın yapılması gerektiğini dşndrmştir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, Kombü çayı ekstraktının gerek tek başına gerekse tetrasiklin ile birlikte *E. coli* O157:H7'nin gelişimini ve çoğalmasını engelleyebileceği ve gen ekspresyonunu azaltabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca tetrasiklinin tek başına bu bakteriyi inhibe edemediği ve incelenen genlerin gen ekspresyonunu azaltamadığı saptanmıştır. Bu durum, *E. coli* O157:H7 suşunun tetrasikline dirençli hale geldiğini göstermektedir. Antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşumu, küresel sağlık sorunları arasında giderek daha önemli bir olgu haline geldiğinden, bu çalışmanın bulguları sağlığa zararı olmayan doğal antimikrobiyal maddelerin araştırılması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın devamı olarak, Kombü çayının alkol, metanol gibi organik çözücülerdeki ekstraktlarının antibakteriyel etkileri analiz edilerek, sulu ekstraktın *E.coli* O157:H7 üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılabilir. Kombü çayının antibakteriyel etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için çeşitli patojenler üzerinde araştırmaların artırılması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

Anjum MF, Schmitt H, Börjesson S, Berendonk TU, Donner E, Stehling EG. The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Current Opinion in Microbiology*. 2021; 64:152-8.

Aarestrup FM, Jensen LB. Presence of variations in ribosomal protein L16 corresponding to susceptibility of enterococci to oligosaccharides (avilamycin and evernimicin). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(12):3425-33.

AbdelGhani S, Thomson GK, Snyder JW, Thomson KS. Comparison of the Carba NP, modified Carba NP, and updated Rosco Neo-Rapid Carb kit tests for carbapenemase detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(11):3539-42.

Abu-El-Azayem AKM, Kotb MM, Arnaout HH, Abdel NS, Latif MS, Mostafa MS. Antibiofilm and antibacterial activity of diclofenac against clinical enterococcal isolates. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;14(3):1507-15.

Afshar ZM, Miladi R, Janbakhsh A, Mansouri F, Sayad B, Vaziri S. The Prevalence and Pattern of Enterobacter Antibiotic Resistance in the Patients Admitted to Imam Reza Hospital in Kermanshah, Iran (2016-2018). *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*. 2021;25(1):1-9.

Ahmed HA, Awad NF, Abd El-Hamid MI, Shaker A, Mohamed RE, Elsohaby I. Pet birds as potential reservoirs of virulent and antibiotic resistant zoonotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2021;75:101-106.

Akarca G. Determination of potential antimicrobial activities of some local berries fruits in kombucha tea production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2021;64:1-15.

Al-Mohammadi A-R, Ismaiel AA, Ibrahim RA, Moustafa AH, Abou Zeid A, Enan G. Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. *Molecules*. 2021;26(16):5026-32.

Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjārv, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., Vilu, R. Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International Journal of Food Microbiology*, 2022;16,373:109715. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715.

Ansari F, Pourjafar H, Kangari A, Homayouni A. Evaluation of the glucuronic acid production and antibacterial properties of kombucha black tea. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2019;20(11):985-90.

Barbosa CD, Santos WCR, da Costa EC, Costa IM, Alvarenga VO, Lacerda IAC. Evaluation of antibacterial activity of black and green tea kombucha. *Scientia Plena*. 2022;18 (9):1-8. doi: 10.14808/sci.plena.2022.091502.

Bassyouni RH, Ahmed FA, Ismaiel AA, Abdelmoneim A, Badran H, El Zahry MA. In-vitro Antifungal Activities of Kombucha Tea Culture Supernatant Combined with Voriconazole against Vulvovaginal Candidiasis Clinical Isolates. *Journal of Health Science and Medical Research*. 2023;41(4):2023933.

Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT-Food Science and Technology*. 2012;47(1):71-77.

Battikh H, Chaieb K, Bakhrouf A, Ammar E. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*. 2013;37(2):231-236.

Bettelheim K. Reliability of CHROMagar® O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. *Journal of Applied Microbiology*. 1998;85(3):425-8.

Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra MM, Chakravorty S, Sarkar S, Chakraborty W. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. *Current Microbiology*. 2016;73:885-96.

Bhattacharya D, Ghosh D, Bhattacharya S, Sarkar S, Karmakar P, Koley H. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against *Vibrio cholerae*: Targeting cell membrane. *Letters in Applied Microbiology*. 2018;66(2):145-52.

Bhattacharya D, Sinha R, Mukherjee P, Howlader DR, Nag D, Sarkar S. Anti-virulence activity of polyphenolic fraction isolated from Kombucha against *Vibrio cholerae*. *Microbial pathogenesis*. 2020;140:103-110.

Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., Thompson-Witrick, K. A. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*. 2022; 1, 100-125.

Brewer SS, Lowe CA, Beuchat LR, Ortega YR. Survival of *Salmonella* and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Changes in Indigenous Microbiota during Fermentation of Home-Brewed Kombucha. *Journal of Food Protection*. 2021;84(8):1366-1373.

Callaway TR, Carr M, Edrington T, Anderson RC, Nisbet DJ. Diet, *Escherichia coli* O157: H7, and cattle: a review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology*. 2009;11(2):67-80.

Coelho EB, Saraiva BB, Rodrigues BM, da Silva Júnior RC, Campanholi KdSS, Maricato DMB. Antibacterial activity of Kombucha against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and Minas Frescal cheese production with Scoby. *Research, Society and Development*. 2022;11(2):1-8

Coelho RMD, de Almeida AL, do Amaral RQG, da Mota RN, de Sousa PHM. Kombucha. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2020;22:100272.

El-Fallal AA, Elfayoumy RA, El-Zahed MM. Antibacterial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles using Kombucha extract. *SN Applied Sciences*. 2023;5(12):332. <https://doi.org/10.1007/s42452-023-05546-x>

Eroğlu, B., Delik, E., Yıldırım, V., Türkanoglu Özçelik, A., Tefon Öztürk, B. E. Investigation of Biochemical and Microbiological Effects of Prunus mahaleb in Fermented Tea Beverage. *Journal of the Institute of Science and Technology*. 2023;13(3):1600-1612.

Food and Drug Administration, *Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, Second Edition, 2012.

Hemeg HA, Moussa IM, Ibrahim S, Dawoud TM, Alhaji JH, Mubarak AS, Kabli SA, Alsubki RA, Tawfik AM, Marouf SA. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(12):3221-3227.

Içen H, Corbo MR, Sinigaglia M, Korkmaz BIO, Bevilacqua A. Microbiology and antimicrobial effects of kombucha, a short overview. *Food Bioscience*. 2023;56:103270,1-12.

Ivanisova E, Meňhartová K, Terentjeva M, Harangozo L, Kántor A, Kačániová M. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*. 2020;57:1840-1846.

Kaewkod T, Bovonsombut S, Tragoolpua Y. Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*. 2019;7(12):700-705.

Kapp JM, Sumner W. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*. 2019;30:66-70.

Keikha M, Rava M. Trend of antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in outpatient patients from Zahedan. *Journal of Paramedical Sciences & Rehabilitation*. 2017;6(4):73-78.

Laurenson S, Villamizar L, Ritchie W, Scott S, Mackay M. Novel use of Kombucha consortium to reduce *Escherichia coli* in dairy shed effluent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(14):6143-6.

Laureys D, Britton SJ, De Clippeleer J. Kombucha tea fermentation: A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2020;78(3):165-74.

Mahmoudi H, Hossainpour H, Moradi M, Alikhani MY. Distribution of iron uptake systems encoding genes among the clinical isolates of *Escherichia coli* compared to foodstuffs isolates. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*. 2020;20(4):517-22.

Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*. 2014;38:171-178.

Mashood AR, Uswege M, Robert M. Current epidemiological status of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in Africa. *Chinese Medical Journal*. 2006;119(03):217-22.

Miranda JF, Ruiz LF, Silva CB, Uekane TM, Silva KA, Gonzalez AGM. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*. 2022;87(2):503-27.

Mizuta AG, de Menezes JL, Dutra TV, Ferreira TV, Castro JC, da Silva CAJ. Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. *LWT*. 2020;130:109641.

Morales D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;105:323-33.

Motafeghi F, Mortazavi P, Shahsavari R, Shaker M, Mohammadi-Berenjestanaki H, Shokrzadeh M. Kombucha Mushroom Extract: Anticancer, Antioxidant, and Antimicrobial Properties. *Applied in Vitro Toxicology*. 2023;9(3):90-103.

Moxley RA. Enterobacteriaceae: *Escherichia*. *Veterinary Microbiology*. 2022;56-74.

Pei J, Jin W, Abd El-Aty A, Baranenko DA, Gou X, Zhang H. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control*. 2020;110(4):106923

Rajaei S, Doudi M, Setorki M, Ahadi AM. Study of the antibacterial effects of Kombucha on the bacterial isolates from diabetic foot ulcer. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2021;8(1):10-8.

Shahbazi, H., Hashemi Gahrue, H., Golmakani, M., Eskandari, M. H., Movahedi, M. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science and Nutrition*. 2018; 6(8), 2568–2577.

Sittipo P, Shim J-W, Lee YK. Microbial metabolites determine host health and the status of some diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(21):5296, 1-26. Doi.org/10.3390/ijms20215296

Soltani M, Farshadfar M, Shirvani H, Yaghotipoor A. Evaluation of the antibacterial effect of a beneficial compound based on the probiotic kombucha and honey. *Honeybee Science Journal*. 2021;11(21):1-10.

Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(6):2589-94.

Tu C, Tang S, Azi F, Hu W, Dong M. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*. 2019;52:81-89.

Vaez H, Kalarestaghi H, Sahebkar A, Khademi F. Prevalence of antibiotic resistance of *Proteus* species in urinary tract infections in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Gene Reports*. 2022;101632.

Vohra, B. M., Fazry, S., Sairi, F., Babul-Airianah, O. Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of kombucha. In *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences, Special Issue on International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Food Technology 2018* (pp. 298–302). Doi.org/10.11113/mjfas.v15n2-1.1536.

Wang B, Rutherford-Markwick K, Naren N, Zhang X-X, Mutukumira AN. Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Black Tea Kombucha Fermented with a New Zealand Starter Culture. *Foods*. 2023;12:2314,1-16

Wang B, Rutherford-Markwick K, Zhang X-X, Mutukumira AN. Kombucha: Production and microbiological research. *Foods*. 2022;11:3456,1-18.

Yang J, Lagishetty V, Kurnia P, Henning SM, Ahdoot AI, Jacobs JP. Microbial and chemical profiles of commercial kombucha products. *Nutrients*. 2022;14(3):670.

Zarei O, Shokoohizadeh L, Hossainpour H, Alikhani MY. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical, environmental and cockroach sources by ERIC-PCR. *BMC Research Notes*. 2018;11(1):1-7.

Zendeboodi F, Khorshidian N, Mortazavian AM, da Cruz AG. Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*. 2020;32:103-23.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### KOMBU ÇAYININ Escherichia coli O157:H7 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>11</b> BENZERLİK ENDEKSİ	% <b>9</b> İNTERNET KAYNAKLARI	% <b>6</b> YAYINLAR	% <b>5</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	-----------------------------------	------------------------	--------------------------------

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% <b>3</b>
<b>2</b>	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	journals.sbmu.ac.ir İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>6</b>	worldwidescience.org İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	Submitted to University of Leeds Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>8</b>	acikerisim.ohu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

nek.istanbul.edu.tr:4444

## ETİK KURUL İZİN YAZISI

**Uyarı:** Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- Etik Kurul izni gerekmektedir.
- Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Maryam KARGAR AGHBOLAGH  
(İmza)

## KURUM İZİNİ YAZILARI

**Uyarı:** Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- Kurum izni gerekmektedir.
- Kurum izni gerekmemektedir.

Maryam KARGAR AGHBOLAGH  
(İmza)