

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE' DE YAYILIŞ GÖSTEREN DÖRT *Thymus* TÜRÜNÜN
UÇUCU YAĞ BİLEŞİMLERİ, ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL
AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selma ÇELEN

Balıkesir, Haziran - 2006

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE' DE YAYILIŞ GÖSTEREN DÖRT *Thymus* TÜRÜNÜN
UÇUCU YAĞ BİLEŞİMLERİ, ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL
AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selma ÇELEN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Dilek AZAZ

Balıkesir, Haziran - 2006

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRKİYE' DE YAYILIŞ GÖSTEREN DÖRT *Thymus* TÜRÜNÜN
UÇUCU YAĞ BİLEŞİMLERİ, ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL
AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selma ÇELEN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Dilek AZAZ

Sınav Tarihi: 31.07.2006

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Ayşe Dilek AZAZ (Danışman) (BAÜ)

Prof. Dr. Bayram YILDIZ (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN (MKÜ)

Balıkesir, Haziran - 2006

ÖZET

TÜRKİYE' DE YAYILIŞ GÖSTEREN DÖRT *Thymus* TÜRÜNÜN UÇUCU YAĞ BİLEŞİMLERİ, ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Selma ÇELEN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Dilek AZAZ)

Balıkesir, 2006

Ülkemizde *Thymus* cinsi (Lamiaceae) 38 tür ile temsil edilmekte olup endemizm oranı % 47'dir. Türkiye'nin farklı lokalitelerinden toplanan *Thymus cilicicus*, *T. canoviridis*'in tüylü (I) ve tüysüz (II), *T. comptus* ve *T. revolutus* türlerinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağlarının GC ve GC/MS ile kimyasal bileşenleri belirlenmiştir. Timol, tüm uçucu yağlarda; *T. canoviridis* (I) % 60,44, *T. canoviridis* (II) % 64,79, *T. cilicicus* % 34,03, *T. comptus* % 55,14 ve *T. revolutus* % 66,96 oranlarında ana bileşen olarak belirlenmiştir. Elde edilen her bir uçucu yağın; *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Escherichia coli* ATCC 25292, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Proteus vulgaris* NRRL 123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*' a karşı antibakteriyel ve antifungal aktivite özellikleri belirlenmiştir. Bütün uçucu yağlar test bakterileri ve *Candida albicans* üzerinde üremeyi durdurucu etki gösterirken, mikrofungalara karşı zayıf antifungal etki gösterdikleri belirlenmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Thymus* sp./ uçucu yağ/ GC/MS/ Antibakteriyel aktivite/ Antifungal aktivite/ Timol.

ABSTRACT

COMPOSITION AND THE IN VITRO ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OILS OF FOUR *Thymus* SPECIES IN TURKEY

Selma ÇELEN

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(M. Sc. Thesis/ Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ)

Balıkesir, 2006

The genus *Thymus* (Lamiaceae) is represented in Turkey by 38 species, the ratio of endemism in the genus is 47 %. Aerial parts of *Thymus cilicicus*, *T. comptus* hairy (I) and hairless (II), *T. revolutus* collected from different localities of Turkey were subjected to hydrodistillation to yield essential oils and analysed by GC and GC/MS. Thymol was found as the main component in the oils of *T. canoviridis* (I) (60,44 %), *T. canoviridis* (II) (64,79 %), *T. cilicicus* (34,03 %), *T. comptus* (55,14 %) and *T. revolutus* (66,96 %). The antibacterial and antifungal activity of five essential oils was evaluated against *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Escherichia coli* ATCC 25292, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Proteus vulgaris* NRRL 123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*. All test bacteria and *Candida albicans* were inhibited by all the essential oils. The essential oils showed weak antifungal activity against all microfungi tested.

KEY WORDS: *Thymus* sp/ Essential oil/ GC/MS analysis/ Antibacterial activity/ Antifungal activity/ Thymol

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri	12
1.2 Uçucu Yağların Sınıflandırılması	15
1.2.1 Kimyasal Bileşimlerine Göre	15
1.2.2 Aromatik Özelliklerine Göre	15
1.2.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre	15
1.3 Bitkisel Materyalin Hazırlanması	16
1.3.1 Toplama	17
1.3.2 Kurutma	17
1.3.2.1 Güneşte Kurutma	17
1.3.2.2 Gölgede Kurutma	18
1.3.3 Saklama	18
1.4 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri	18
1.4.1 Distilasyon Yöntemi	19
1.4.1.1 Su Distilasyonu	19
1.4.1.2 Su ve Buhar Distilasyonu	19
1.4.1.3 Buhar Distilasyonu	20
1.4.1.4 Kuru Distilasyon	20
1.4.1.5 Hidrodifüzyon	20
1.4.2 Ekstraksiyon Yöntemi	21
1.4.2.1. Organik Çözücü ile Ekstraksiyon	21
1.4.2.2 Sabit Yağ ile Ekstraksiyon	21
1.4.2.3 Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon (SAE: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu)	22
1.4.3 Mekanik Yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)	23
1.5 Uçucu Yağdaki Bileşiklerin Belirlenmesi	23
1.6 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	24

1.6.1 Disk Difüzyon (Kirby- Bauer) Yöntemi	24
1.6.2 Tüp Dilüsyon Yöntemi	25
1.7 Labiatae (Lamiaceae) Familyasının Genel Özellikleri	26
1.8 <i>Thymus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	26
1.9 Türkiye’de Yetişen <i>Thymus</i> Türleri ve Yayılışları	27
2. MATERYAL VE METOT	29
2.1 Materyal	29
2.1.1 Bitkisel Materyal	29
2.1.1.1 Araştırmada Kullanılan <i>Thymus</i> Türlerinin Genel Özellikleri	29
2.1.2 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri	33
2.1.3 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Besiyerleri ve Standartlar	38
2.2 Metot	43
2.2.1 Uçucu yağların Bileşenlerinin Belirlenmesi	43
2.2.1.1 Gaz Kromatografisi	43
2.2.1.2. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS)	43
2.2.2 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	44
2.2.2.1 Agar Disk Difüzyon Metodu	44
2.2.2.2 Mikrobrot Dilüsyon Metodu	45
2.2.2.3 Antifungal Aktivite	46
3. BULGULAR	47
3.1 Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonları	47
3.2 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	52
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	54
5. KAYNAKLAR	61

KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
ATCC	American Type Culture Collection, U.S.A
°C	Santigrat Derece
FID	Flame Ionization Dedector
ml	Mililitre (10^{-3} litre)
mm	Milimetre (10^{-3} metre)
NRRL	Northern Regional Research Laboratory, U.S.A
Rt	Retention Time
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
SAE	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MFK	Minimum Fungisid Konsantrasyonu
µg	Mikrogram (10^{-6} gram)
µl	Mikrolitre (10^{-6} litre)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 2.1	<i>Thymus cilicicus</i> 'un genel görünüşü	30
Şekil 2.2	<i>Thymus revolutus</i> 'un genel görünüşü	31
Şekil 2.3	<i>Thymus comptus</i> 'un genel görünüşü	32
Şekil 2.4	<i>Thymus canoviridis</i> 'in genel görünüşü	33
Şekil 3.1	<i>Thymus canoviridis</i> (I) Uçucu Yağının Bileşenleri	50
Şekil 3.2	<i>Thymus canoviridis</i> (II) Uçucu Yağının Bileşenleri	50
Şekil 3.3	<i>Thymus cilicicus</i> Uçucu Yağının Bileşenleri	50
Şekil 3.4	<i>Thymus comptus</i> Uçucu Yağının Bileşenleri	51
Şekil 3.5	<i>Thymus revolutus</i> Uçucu Yağının Bileşenleri	51

TABLO LİSTESİ

Tablo Numarası	Adı	Sayfa
Tablo 3.1	Çalışmada kullanılan <i>Thymus</i> türlerine ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri	48
Tablo 3.2	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının Disk Difüzyon Metoduna Göre Antimikrobiyal Aktiviteleri (mm)	52
Tablo 3.3	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının Mikrodilüsyon Metoduna Göre Antimikrobiyal Aktiviteleri (MİK) ($\mu\text{g/ml}$)	53
Tablo 3.4	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının Antifungal aktiviteleri (% inhibisyon Değerleri)	53

ÖNSÖZ

Araştırmamıza konu olan *Thymus* cinsi üyeleri ülkemiz’de kekik ya da taş kekik olarak bilinmektedirler. Kurutulan toprak üstü kısımları halk arasında bitkisel çay ve yemeklere aroma ve tat verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca soğuk algınlığı giderici, kan dolaşımını uyarıcı, astım ve şeker hastalıklarını iyileştirici olarak da kullanılmaktadırlar. Bizde halk arasında *Thymus* türlerinin tedavi amaçlı kullanımlarından yola çıkarak, bazı *Thymus* türlerinin antimikrobiyal özelliklerini bilimsel olarak belirlemek istedik.

Çalışmamın başlangıcından bitimine kadar çok değerli bilgi birikimlerini, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. A. Dilek AZAZ’ a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, beni her zaman destekleyen değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2006

Selma ÇELEN

1. GİRİŞ

İnsanlığın tarihine bakıldığında insanoğlu çevresindeki canlı cansız her materyalden faydalanma yoluna gitmiştir. Bunlardan bir tanesi de bitkilerdir. Besin olarak ve yakacak olarak, silah ve mesken yapımında, boya yapımında, süs olarak ve hastalıkları tedavi amacıyla bitkilerden yararlanma yolları aranmıştır [1,2].

Bitkilerle tedavi insanlık tarihi kadar eskidir. İlk çağlardan beri insanlar çevrelerindeki bitkileri kullanarak dertlerine şifa aramışlardır. Faydalı gördükleri bitkileri tanımış, tanıtmış ve tekrar tedavi ettikleri hastalıklarda o bitkileri kullanmışlardır [3].

Bitkilerin tedavi amacı ile kullanışlarını tarif eden en eski eserler Çinlilerindir. Chen-Nung'un "Materia Medica" adlı eseri M.Ö. 3217 yılında yazılmıştır. Kitapta iki yüzün üzerinde tıbbi bitkiden söz edilmektedir [4,5]. Tıbbi bitkiler konusunda en eski ve en önemli belgelerden bir tanesinde Mısır'da M.Ö. 1550 ve daha eski zamanlarda yazılmış Papyrus Ebers'dir [6]. Bunların yanında bitkilerin hastalıklara karşı ilaç olarak kullanımı, M.Ö. 50.000 yıllarına kadar uzanmaktadır. Hakkari'nin hemen güneyinde yer alan Şanidar Mağarası'nda ortaya çıkarılan Neandertal mezarlar içinde bulunan ve halen bölgede tıbbi maksat için kullanılan bitki örnekleri, paleolitik çağdan beri bitkilerin bu amaçla kullanıldıklarını destekler niteliktedir [2].

Dünyamız 21. yüzyıl içinde ilerlerken yalnız ilaç değil, doğal olmayan birçok yapay ürün de yaşantımıza girmiş ve girmektedir. Hatta eskiden daha seyrek görülen ya da bilinmeyen birçok hastalığın insan yaşamını tehdit etmesinin nedeni sentetik maddelerde aranmaktadır. Bu nedenle bugün doğal ürünlere büyük bir ilgi doğmuştur [7]. Batı toplumlarında doğal, daha az yapay katkılı yiyecek tüketmek isteyen "Yeşil" tüketici akımı oluşmuştur [8].

Gelişmekte olan birçok ülkede nüfusun büyük bir oranının birincil sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için geleneksel tedavi yöntemlerine ve tıbbi bitkilere ağırlıklı olarak güvendiği ileri sürülmektedir. Aynı zamanda gelişmiş ülkelerde birçok insan bitkisel ilaçlara, alternatif yada tamamlayıcı tedaviye dahil ederek dönmeye başladı [9]. “Yeşil dalga”, “Yeşil İlaç” adıyla anılan ilaç ve tedavide doğaya dönüş akımı tüm Avrupa ve Amerika’yı etkisi altına almaktadır [10].

Sanayileşmiş ülkelerde hastalıklardan, bozulmalardan ve zararlı böceklerden; besi hayvanlarını ve gıdaları korumak için geleneksel yöntemlere yani bitkilere yeniden ilgi duyulduğu görülmektedir [11].

WHO’nun 91 ülkenin farmakopelerine ve tıbbi bitkiler üzerine yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin toplam miktarı 20000 civarındadır [2].

Ancak G. Penso’nun yaptığı bir araştırmaya göre Türkiye’de 140 kadar tıbbi bitki kaydedilmiştir. Bunlar 1948 ve 1974 Türk kodekslerinde kayıtlı bitkilerdendir. Halbuki halen Türkiye’de tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin çeşidi en az 500 civarındadır. Bu örneğin diğer ülkeler içinde düşünülürse dünyada gerçekte tıbbi bitki sayısının 100000 civarında olması gerekmektedir [2].

Avrupa ülkelerinden Fransa, İsviçre ve özellikle Almanya’da bitkisel ilaçları modern tıpla birleştirmek için bir eğilim vardır [12] Almanya’da 500 farklı bitkiden bitkisel ilaç üretimi için yararlanılmakta ve bunların 200 ’ü çok sık kullanılmaktadır. Halkın % 52 ’si önemsiz hastalıkların ilk tedavisi için bitkisel ilaçları kullanmaktadır. Romanya, Macaristan ve Bulgaristan gibi ülkelerde de bitkilerle tedavi bir devlet politikası halindedir. Bu ülkelerde tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi bir gelenektir ve ilk ham drog talebi bu ülkelere karşılanmıştır. Bu amaçla, Avrupa’da tıbbi bitkilerin yetiştirildiği alanlar gün geçtikçe artmaktadır [13].

Uzakdoğu ülkelerinde örneğin Japonya’da modern tıbbın yanında bitkilerle tedaviye dayanan geleneksel Çin, Kore, Japon tedavi sistemleri yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Kore’nde bitkilerle tedavideki yerini son yıllarda değişik

ülkelerde yaygın bir şekilde kullanılmaya başlayan “Ginseng” örneğini vererek gösterebiliriz. Hindistan yarımadasında da modern tıbbın yanında, geleneksel tıptan yararlanır. Bu ülkede tıbbi bitkiler “Araştırma-Geliştirme Faaliyetleri” adı altında incelenmektedir. Özellikle antibakteriyel ilaç geliştirme konusu oldukça büyük önem kazanmıştır [14].

Amerika’da halen ticari olarak bitkilerden elde edilen ilaçların % 75 ’i, etnobotanik bilgiler sonucunda elde edilmiştir. Amerika’da reçetelenmiş ilaçların % 25 ’i doğal ürünlerken, diğer bir % 25 ’de doğal ürünlerden hareketle türetilen maddelerden oluşmaktadır. Rusya’da kullanılan ilaçların üçte birinden fazlası bitkisel kökenli olup sentetik birçok ilacın ortaya atılmasına karşılık bu oran değişmemektedir [12].

WHO tanımlamasına göre “Bitkisel İlaç”, aktif içerik olarak bitkilerin toprak altı ve toprak üstü kısımlarını (çiçek, kabuk, kök, meyve, tohum, yaprak gibi) ya da başka bitkisel materyali veya bunların kombinasyonunu ham halde veya bitkisel preparatlar halinde taşıyan, günümüz ilaç endüstrisi teknolojisinin tüm gerek ve kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve etiketlenmiş tıbbi ürünlerdir. Bitkisel materyal usare, zamk, sabit veya uçucu yağlar ve bu yapıda diğer maddeleri kapsar. Kimyasal olarak tanımlanmış, etken maddelerle kombine edilmiş bitkisel materyal taşıyan ve bitkiden saf olarak izole edilmiş kimyasal madde içeren ürünler bitkisel ilaç olarak kabul edilmemektedir [12].

Tüm dünyada bitkisel ilaçlarla tedavi giderek artmakta ve şimdiye kadar görülmemiş popülerite kazanmaktadır. Bitkisel ilaca ilginin yeniden canlanmasının başlıca nedenleri, modern ilaçların her hastalığı tedavi etme yeteneğine sahip olmamaları, çok pahalı oluşları ve birçok yan etkilerinin bulunuşudur. Öyle ki bazı sentetik ilaçların yan etkilerini önleyebilmek için diğer bazı ilaçlarla birlikte kullanılma ihtiyacı göstermektedirler. Bunların yanı sıra bitkisel droglardan elde edilen bazı ilaç etken maddelerinin sentetik olanlardan daha ucuza ve kolaylıkla elde edilebilir olması, bitkisel drogların birkaç etkiye birden sahip olmaları sayılabilir [2, 12, 15].

Patojenlerin, yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesi; araştırmacıları enfeksiyonlara karşı yeni ve etkili antimikrobiyal maddeler geliştirmek için yöneltmiştir [15, 16].

Bitkilerin biyolojik yönden aktif birçok bileşik içerdiği ve bu bileşiklerin birçoğunun antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple mikrobiyal hastalıklarla mücadelede etkili maddelerin kaynağı olarak bitkilere yönelme artmıştır [16].

Eski çağlardan beri aromatik ve tıbbi bitkiler ve onların ekstraktlarının antiseptik özellikleri kaydedilmiştir. Ancak bu özellikleri 1900'lerin başlarında laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır [11]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, bitkilerin sekonder metabolizma ürünü olan uçucu yağların, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal, antitoksijenik, antiviral, antiparazitik, antioksidant, antikarsinojenik ve insektisidal özellik gösterdiği gözlemlenmiştir [11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. Bundan dolayı farmakolojide, eczacılıkta, fitopatolojide, tıbbi ve klinik mikrobiyolojide, koruyucu madde olarak da gıdalarda kullanılmaktadır [11, 34].

Uçucu yağ terimi ilk kez 16. yüzyılda İsveçli tıp reformcusu olan Paracelsus von Hohenheim'in ilaçların etken bileşimini "Quinta essentia" olarak isimlendirmesiyle ortaya çıkmıştır [35]. Uçucu yağlar, bitkinin çiçeklerinden, tomurcuklarından, yapraklarından, dallarından, tohumlarından, meyvelerinden ve kök elde edilen aromatik sıvı yağdır [8, 11].

Bitkilerden uçucu yağ elde edebilmek için distilasyon metodu ilk kez 2000 yıl önce Mısırlılar, Persler ve Hintliler tarafından kullanılmış ve 9. yüzyılda Araplar tarafından geliştirilmiştir [36]. Romalı ve Yunanlı tarihçileri uçucu yağ olarak sadece nefit yağından bahsetmişlerdir [35]. 13. yüzyıl başlarında uçucu yağlar eczacılık alanında kullanılmaya başlanmış ve uçucu yağların farmakolojik etkileri, ilaç kodekslerinde tarif edilmiştir [36]. Fakat 16. yüzyıla kadar Avrupa'da yaygın olarak kullanılmamıştır [37]. Bu yüzyılda uçucu yağların kullanımı ve distilasyon metotları hakkında yayınlar çıkmıştır. Strassburg'lu iki hekim Brunschwing ve Reiff

de bazı bitkilerin uçucu yağlarından sadece yüzeysel olarak bahsetmişlerdir ve bahsettikleri uçucu yağlar arasında neft, ardıç ağacı, biberiye, lavanta, karanfil, hindistan cevizi, anason ve tarçın bulunmaktadır. 17. yüzyılda Fransız hekim Du Chesne, uçucu yağların nasıl hazırlanması gerektiğini biliyor ve drog olarak 15 -20 farklı yağ kullanıyordu [35]. 18. yüzyılın sonlarına doğru Avustralya kolonilerinde çay ağacı yağının tıbbi amaç için kullanıldığı kaydedilmiş olmasına rağmen Avustralya yerlileri tarafından daha önceden de benzer amaçlar için bu yağ kullanılıyordu [38].

Uçucu yağların bakterisidal özellikleri, ilk kez deneysel olarak 1881’ de Dela Croix tarafından belirlenmiştir [39]. Bununla beraber 19. ve 20. yüzyıllarda uçucu yağların tıp alanındaki kullanımında giderek artış gözlemlenmiştir [35].

Günümüzde yaklaşık olarak 3000 çeşit uçucu yağ bilinmektedir ve bunlardan 300 tanesi ticari öneme sahiptir [40]. Avrupa’da uçucu yağlar, büyük oranda besinlerde, parfümeride ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır [40, 41, 42]. Uçucu yağların aromaterapi içeriğinde % 2 oranında yer aldığı iyi bilinmektedir [40]. Ayrıca; uçucu yağların kimyasal kompozisyonunu oluşturan bileşenlerin her biri besinlerin tatlandırılmasında kullanılmakta ve bitki materyalinden elde edilebilmelerinin yanı sıra sentetik olarak da doğal yapılarına uygun olarak laboratuvarlarda sentezlenmektedirler [43].

Uçucu yağlar ve onların bileşenlerinin antibakteriyel özelliklerinden; diş kökü kanal tedavisinde dolgu maddesi, antiseptik, dişi ve yavru domuzların beslenmesinde besin desteği gibi çeşitli ticari ürünlerde yararlanılmıştır [41, 44, 45, 46, 47]. Bazı bitkisel uçucu yağlar ise gıda sanayinde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Örneğin “DMC Base Natural”, İspanya’nın Granada-Alhendin bölgesinde DOMCA S.A. tarafından üretilen; % 50 ’si biberiye, adaçayı ve turunçgillerin uçucu yağından, % 50 ’side gliserolden oluşan ve besin bozulmasını önleyen koruyucu bir üründür [48]. Amerika’da da Bavaria Corp. Apopka, FL. tarafından bitki ekstraktlarını karıştırarak üretilen “Protecta One” ve “Protecta Two” genel olarak güvenli besin katkı maddesi olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu ürünlerin bileşimleri ise ticari kaygılardan dolayı firmalar tarafından açıklanmamaktadır. Muhtemelen bu

ekstraktlar sodyum sitrat ve sodyum klorid solüsyonlarında dağılmış halde bir ya da daha fazla uçucu yağ içeriyor olabilirler [49]. Bunlardan başka uçucu yağların fizyolojik etkileri çok çeşitli ticari ürünlerde kullanılmaktadır. Örneğin ziraat alanında patateslerin filizlenmesini önlemek amacı ile ve böcek kovucu olarak kullanıldığı bilinmektedir [38, 50].

Çeşitli uçucu yağların kimyasal kompozisyonlarının rapor edildiği çok sayıda yayın mevcuttur. Örneğin Bauer ve arkadaşlarının (2001), ekonomik olarak önemli uçucu yağların, ana bileşenlerini anlatan bir yayınları vardır [8]. Uçucu yağların kompozisyonlarının içeriği ise GC-MS analizleriyle belirlenebilir [51, 52, 53, 54, 55, 56, 57]. Uçucu yağlar 60 'tan fazla bileşen ihtiva edebilirler [58, 59]. Uçucu yağ kompozisyonunun % 85 'inden fazlasını ana bileşenler oluşturmaktadır. Diğer bileşenler ise sadece eser miktarlarda bulunmaktadır [36, 58]. Uçucu yağların, antibakteriyel özellik göstermesinin başlıca nedeni içerdikleri fenolik bileşiklerdir [60]. Bazı belirtiler ise minor bileşiklerin antibakteriyel aktivitede kritik role sahip olduklarını ve diğer bileşenlerle sinerjik etki oluşturmaları mümkün olduğunu gösteriyor. Bu duruma adaçayı, *Origanum vulgare* ve bazı *Thymus* türleri ile ilgili çalışmalarda rastlanmıştır [61, 62, 63, 64].

Bitkinin uçucu yağ kompozisyonunu oluşturan bileşenler; bitkinin yetiştiği coğrafik bölgeye ve toplama zamanlarına göre farklılık gösterirler [55, 60, 64, 65, 66, 67, 68]. Bunun nedeni kısmen bazı bileşenlerin kendi öncülerinden sentezlenmesi olarak açıklanabilir. Örneğin, *Origanum* ve *Thymus* türlerinde *p*-simen ve γ -terpinen bileşenleri karvakrol ve timol'ün öncü maddeleridir [55, 60, 69]. Bu dört bileşenin, Yunanistan'ın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Origanum vulgare* uçucu yağındaki miktarlarının toplamının hemen hemen eşit olduğu rapor edilmiştir [56, 70]. Aynı durum İtalya'dan toplanan *Thymus vulgaris*'in uçucu yağ kompozisyonu için de rapor edilmiştir [64]. Buna göre *p*-simen, γ -terpinen, karvakrol ve timol'ün biyolojik ve fonksiyonel olarak yakın ilişkide olduğu ve *Thymus vulgaris*'deki γ -terpinen'den *p*-simen aracılığıyla timol'ün şekillendiği teorisinin desteklendiği rapor edilmiştir [70].

Bitkilerden, hasat zamanı ya da çiçeklenme döneminden hemen sonra elde edilen uçucu yağların, genellikle güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [64, 67]. Ayrıca uçucu yağ bileşenlerinin enantiomerlerinin farklı büyüklüklerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [71].

Aynı bitkinin farklı bölümlerinden elde edilen uçucu yağların kompozisyonlarının da farklılık gösterdiği saptanmıştır ve örnek olarak *Coriandrum sativum* (kişniş) tohumlarından elde edilen uçucu yağ kompozisyonu ile aynı bitkinin olgunlaşmamış yapraklarından elde edilen uçucu yağ kompozisyonunun birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir [57].

Bugün doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık 1/3 'ü uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağlar daha çok çiçekli bitkilerde bulunmaktadır. En fazla uçucu yağ içeren familyalar ise Pinaceae, Lamiaceae (Labiatae), Apiaceae (Umbelliferae), Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Asteraceae (Compositae), Piperaceae, Brassicaceae, Iridaceae, Verbenaceae ve Ranunculaceae olarak belirtilmiştir. Bu familyalara dahil uçucu yağ içeren pekçok tür bulunmaktadır [4, 72]. Günümüzde ticari amaçla üretimi yapılan uçucu yağ bitkilerinin sayısı 40 'ı geçmektedir. Özellikle bazı familyalar uçucu yağ taşıyan türleri nedeni ile önem kazanmıştır. Lamiaceae familyasında bulunan ve birçok Avrupa ülkesinde üretimi yapılan *Thymus* türleri, *Lavandula* türleri, *Mentha* türleri ve diğer bazı bitkiler değerli uçucu yağ kaynaklarıdır [72].

Lamiaceae kozmopolit bir familya olup, başta Akdeniz fitocoğrafik bölgesi olmak üzere yeryüzünün bütün bölgelerine yayılmış, yaklaşık 170 – 250 cins ve 3000 – 3500 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye'de ise 45 cins ve 546 'dan fazla tür ile önemli familyalardandır. Familya üyelerinin çoğu uçucu yağ içermelerinden dolayı farmokoloji, parfümeri ve kozmetik sanayisi için önem arz etmektedir [72, 73, 74, 75].

Thymus cinsi de Lamiaceae familyasına ait uçucu yağ içeren bitkiler arasında olup, çok sayıda tür ve tür altı taksona sahiptir. Birçok türü Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde yayılış gösterir [60]. *Thymus* uçucu yağlarından gıda sanayisinde çeşitli

besinlerde, içeceklerde ve şekerlemelerde lezzet verici olarak bunun yanında antimikrobiyal özelliklerinden dolayı gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Parfümeri sanayisinde ise sabun ve losyonlarda koku olarak yararlanılmaktadır. *Thymus* uçucu yağlarının antioksidant özelliklerinden dolayı beslenmede destekleyici olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca *Thymus* uçucu yağları antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antispazmodik, antitussif, ekspektoran, analjezik özelliklerinden dolayı tıp ve farmakoloji alanlarında da kullanılmaktadır [18, 60, 76, 77, 78].

Thymus cinsine ait türler ülkemizde kekik ya da taş kekik olarak bilinir [79, 80]. Halk arasında daha çok yemeklere aroma kazandırmak için kullanılmalarının dışında; şeker hastalığı tedavisinde, kan dolaşımının düzenlenmesinde, safra artırıcı, kurt düşürücü, soğuk algınlığı giderici, astım da nefes darlığı giderici ve iştah açıcı olarak halk ilacı şeklinde kullanılmaktadır [2, 81, 82, 83].

Dünya genelinde *Thymus* cinsinin 162 taksonunun uçucu yağları analiz edilmiştir. Bu çalışmalar sonunda *Thymus* türlerinin uçucu yağlarında 360 farklı bileşen saptanmıştır. Bu bileşenlerin % 75 'i terpenlerdir. Terpenlerin ise % 43 'ü monoterpenler, % 32 'si seskiterpenlerdir. Terpenoidlerin dışındaki bileşenlerin oranı düşüktür. GC, GC/MS gibi analitik teknikler geliştikçe kimyasal analizler kolaylaşmış ve bugün kimyasal maddelerin bileşimi % 95 oranında tanımlanabilmektedir [84].

Yapılan analizler sonucunda *Thymus*'larda yaklaşık 270 terpen olduğu saptanmakla birlikte bunlardan bir ya da birkaçının baskın olduğu rapor edilmiştir. Özellikle timol, karvakrol, linalool, *p*-simen, geraniol, borneol en önemli terpenlerdir. Bitkiler aleminde monoterpenoid fenollerin en önemli kaynağı ise *Thymus* türleridir [85].

Son yıllarda *Thymus* uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu ve/veya biyolojik özellikleri hakkında bir çok çalışma yapılmıştır. Başer ve arkadaşları (2002) *Thymus migricus* Klokov et Des.-Shost ve *Thymus fedtschenkoi* var. *handelii* (Ronniger) Jalas. türlerine ait bitki örneklerinin hidrodistilasyon ile uçucu yağlarını

elde etmişler ve GC-MS ile de uçucu yağların analizini yapmışlardır. *T. fedtschenkoi* var. *handelii* uçucu yağının ana bileşenini linalool (% 13) olarak tesbit etmişlerdir. Dört farklı lokaliteden toplanan *T. migricus* örneklerinin uçucu yağlarının ana bileşenlerini iki örnekte karvakrol (% 36 - 37) diğer iki örnekte ise timol (% 36 - 44) olarak belirlemişlerdir [79].

Kabouche ve arkadaşları (2005) Constantine (Tunus) bölgesinde yetişen *Thymus numidicus* Poiret türünün bitki örneklerinin hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağını elde etmişler ve GC-MS yöntemiyle analizini yapmışlardır. *Thymus numidicus* uçucu yağının ana bileşenini timol (% 68,2) olarak belirlemişlerdir [78].

2002 yılında Hedhili ve arkadaşları Kobra (Tunus) bölgesinde doğal olarak yetişen *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et. Link türünün bir yıllık vejetasyon döngüsü boyunca her ay örneklerini toplamış ve bu örneklerin buhar distilasyonu yöntemiyle uçucu yağını elde etmişlerdir. Uçucu yağların analizlerini de GC ve GC-MS yöntemiyle belirlemişlerdir. Sonuç olarak uçucu yağın veriminde çiçeklenme döneminde (% 2 - 1,08) artış, dormansi döneminde (% 0,2) ise azalma gözlemlenmiştir. *Thymus capitatus* uçucu yağının bileşenlerinde de, vejetasyon döneminin farklı safhalarında değişiklikler gözlemlenmiştir. Çiçeklenme döneminde yüksek oranda karvakrol (% 71,8) içerdiğini ve *p*-simen'i ise karvakrolun minimum olduğu zaman maksimum olarak belirlemişlerdir [76].

Giordani ve arkadaşları (2004) *Thymus vulgaris* L. altı (6) farklı kemotipi ve *Satureja montana* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Lavandula hybrida* Reverchon, *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L.'ın uçucu yağlarının *Candida albicans*'ın üremesi üzerine etkilerini Broth dilüsyon yöntemi kullanılarak araştırmışlardır. Sonuçta *Candida albicans*'a karşı en etkili uçucu yağın ana bileşeni timol (% 63,22) olan *T.vulgaris*'e ait olduğunu belirlemişlerdir ve MİK değeri 0,016 µL/mL olarak bulmuşlardır [86].

Rasooli ve Mirmostafa tarafından (2002) *Thymus pubescens* Boiss. ve *T. serpyllum* L.'un çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme dönemi uçucu yağlarının içeriği ile antibakteriyel özellikleri araştırılmıştır. Alınan sonuçlara göre *T. pubescens*

çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme döneminde uçucu yağının ana bileşenini timol (% 64,79 - 48,75), *T. serpyllum* türünde ise çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme döneminde uçucu yağın ana bileşenlerini; γ - terpinen (% 21,90 - 22,69), *p*-simen (% 21,22 - 20,68) ve timol (% 18,73 - 18,68) olarak belirlemişlerdir. Her iki *Thymus* türünde de çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme dönemi uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitelerinin farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. *T. pubescens* ve *T. serpyllum* uçucu yağlarının farklı mikroorganizmalara karşı mikrobiyal inhibisyon zonlarının ölçüleri temel olarak 26 - 41 mm ve 15 - 40 mm arasında belirlemişlerdir [18].

Başer ve arkadaşları (1996) *T. eigi* (M. Zohary et P.H. Davis) Jalas. uçucu yağının içeriğini GC ve GC-MS yöntemleriyle belirlemişler ve ana bileşeninin karvakrol (% 64,61) olduğunu rapor etmişlerdir [87].

Bağcı ve Başer (2005) Türkiyenin Doğu Anadolu Bölgesinden topladıkları *T. haussknechtii* Velen. ve *T. kotschyanus* Boiss. et Hohen var. *kotschyanus* taksonlarının uçucu yağlarını hidrodistilasyon ile elde etmişler ve GC-MS yöntemiyle analizini yapmışlardır. *T. haussknechtii* uçucu yağının ana bileşenini 1,8-sineol (% 21,5), *T. kotschyanus* var. *kotschyanus*'ta ise uçucu yağın ana bileşenini timol (% 47,5) olarak belirlemişlerdir [80].

Cosentino ve arkadaşları (1999) İtalya'nın Sardinya bölgesinden topladıkları uç ve ticari olarak satılan bir *Thymus* örneğinden elde ettikleri uçucu yağların GC/MS ile kimyasal kompozisyonlarını belirlemişler ve ayrıca uçucu yağların antimikrobial özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmalarında Sardinya bölgesinde topladıkları *T. capitatus* (L.) Hoff. & Link. uçucu yağının ana bileşenini olarak timol (% 29,3) ve *p*-simen (% 26,4)' i ticari olarak satılan örnekte ise timol (% 46,1) ve α -pinen (% 25,2)' i ana bileşen olarak rapor etmişlerdir. Sardinya'nın kuzeyinden topladıkları *T. herba-barona* Lois. uçucu yağında ise timol (% 50,3) ve *p*-simen (% 27,6), Sardinya'nın merkezinden topladıkları *T. herba-barona*'da ise timol (% 46,9) ve karvakrol (% 20,6)' ü ana bileşen olarak rapor etmişlerdir. Genellikle örneklerden elde edilen uçucu yağların aynı mikroorganizmalara karşı benzer etki gösterdiğini fakat Sardinya'nın merkezinden toplanan *T. herba-barona*'nın uçucu yağının

antimikrobiyal aktivitesi diğer örneklerle göre daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. *T. herba-barona* özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*'ya karşı daha etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir [60].

Rasooli ve arkadaşları (2006) İran Ulusal Botanik Bahçesin'den topladıkları *T. eriocalyx* (Ronniger) Jalas ve *T. x-porlock* örneklerinin uçucu yağ içeriklerini GC ve GC-MS yöntemiyle belirlemişler ve ayrıca uçucu yağların antifungal özelliklerini araştırmışlardır. *T. eriocalyx* uçucu yağının ana bileşenleri timol (% 63,8) ve β -phellandrene (% 13,3) *T. x-porlock* uçucu yağının ana bileşenlerini ise β -phellandrene (% 38,7) ve timol (% 31,7) olarak rapor etmişlerdir. *Aspergillus niger*'re karşı örneklerin uçucu yağlarının antifungal aktivitelerini, minimum inhibisyon (MİK) ve minimum fungisid (MFK) konsantrasyonlarını uçucu yağların fungisidal kinetiğiyle belirlemişlerdir. Sonuç olarak *T. eriocalyx* uçucu yağının, *T. x-porlock*'ın uçucu yağına göre daha düşük MİK/MFK değerlerine sahip olduğunu, fakat *T. eriocalyx* uçucu yağının *T. x-porlock*'ine göre fungus sporlarını daha yavaş şekilde öldürdüğünü rapor etmişlerdir [77].

Başer ve arkadaşları (1992) Eskişehir'in Bozdağ Atalantekke mevkisinden çiçeklenme döneminde toplanan *T. leucostomus* var. *argillaceus* uçucu yağının ana bileşenlerini GC ve GC/MS yöntemleri ile timol (% 27) ve karvakrol (% 22) olarak rapor etmişlerdir [88].

Başer ve arkadaşları (1999) Çankırı Çallı köyünden *T. leucostomus* var. *gypsaceus* ve Malatya Arapkır bölgesinden topladıkları *T. pubescens* var. *cratericola* uçucu yağlarının bileşenlerinin kompozisyonunu GC/MS yöntemiyle analiz etmişler ve *T. leucostomus* var. *gypsaceus* uçucu yağının ana bileşenlerini timol (% 33,2) ve borneol (% 22,2), *T. pubescens* var. *cratericola* uçucu yağının ana bileşenlerini de karvakrol (% 17,5), *p*-simen (% 16,4) ve timol (% 10,8) olduğunu belirlemişlerdir [89].

Tümen ve arkadaşları (1999) *T. fallax* türünden hidrodistilasyon ile elde ettikleri uçucu yağın içeriğini GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve karvakrolun (% 68,1) ana bileşen olduğunu rapor etmişlerdir [90].

Başer ve arkadaşları (1999) *Thymus zygoides* var. *zygoides* uçucu yağının GC/MS yöntemiyle içeriğini belirlemiş ve ana bileşenlerini linalol (% 33,7) ve (E)-nerolidol (% 12,5) olduğunu saptamışlardır [91].

Başer ve arkadaşları (1996) Türkiye'nin farklı lokalitelerinden topladıkları *T. zygoides* var. *lycaonicus*'un dört kemotipinin uçucu yağ içeriklerini geraniol (% 68,55), karvakrol (% 48,14), α -terpinil asetat (% 36,18) ve timol (% 41,75 - % 57,18) olarak rapor etmişlerdir [92].

1.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri

Uçucu yağlar, bitkilerden ya da bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, su buharı ile sürüklenebilen, kolaylıkla kristalleşebilen uçucu özellikte, kuvvetli kokulu, yağimsı karışımlardır. Birçok bitkilerin karakteristik kokuları, içerdikleri uçucu yağdan kaynaklanmaktadır. Uçucu yağlar açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden bunlara uçucu yağ veya eterik yağ denilmektedir. Ayrıca su ile karışmadıklarından ve su yüzeyinde tabaka oluşturduklarından, “yağ” adı ile anılırlar. Bunların yanında uçucu yağlar genellikle güzel kokulu olduklarından ve bir de parfüm sanayiinde kullanıldıklarından “esans” olarak da adlandırılmaktadırlar. [72].

Uçucu yağ içeren bitkiler daha çok sıcak iklim bölgelerinde yetişmektedirler. Tropik ve subtropik bölgelerle ılıman iklim kuşağının sıcak bölgelerinde bulunmaktadırlar. Soğuk iklimlerde daha az sayıda aromatik bitki bulunmaktadır. Ülkemizi de içine alan Akdeniz Fitocoğrafik bölgesi ise uçucu yağ taşıyan bitkiler açısından en zengin alanlardan birisidir [72].

Uçucu yağlar bitkinin tüm organlarında veya bitkinin belirli bir organında bazen de bir organın belirli dokularında da bulunabilmektedir. Bitkilerin bulunduğu familyalara göre salgı tüylerinde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve nadiren parankima dokusu içinde yayılmış olarak bulunurlar. Uçucu yağın bitkide ya doğrudan doğruya protoplazmada ya da hücre çeperinin özel bir tabakasında oluştuğu ileri sürülmekle birlikte glikozitlerin hidrolizi yoluyla da meydana gelebildiği belirlenmiştir [2, 93, 94]. Bir çok bitki sekonder metabolitler olan uçucu yağları normal büyüme ve gelişim dönemlerinde yada patojen saldırılara karşı veya strese tepki olarak üretmektedirler [17].

Uçucu yağların bitkilerde neden oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Belki bitkinin yararsız metabolizma ürünlerinin atılmasında bir rol oynuyorlardır, yani detoksifikasyon ürünleridir. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar, koruyucu ajanlardır ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözünmesini sağlarlar. Uçucu yağların böcekleri kaçırma yada çekmek için oluştuğunu düşünenlerde vardır. Buna bağlı olarak ya bitkiyi korurlar, yada tozlaşmaya yardımcı olurlar [95].

Uçucu yağlar taze iken genellikle renksiz veya açık sarı renklidir. Fakat karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye veya papatya yağı gibi yeşilden maviye kadar değişik renkte olanları da vardır. Uzun süre saklamada, ışık ve oksijenin etkisi ile oksitlenerek bazıları koyulaşıp reçineleşebilir. Bu durumda genellikle bir koku değişimine ve yağın kalitesinin azalışına sebep olur. Bu nedenle yağlar serin bir yerde ve ışıktan korunmak için koyu renkli şişelerde saklanmalıdırlar [8, 10, 93, 94, 96].

Fiziksel özellikleri yönünden birbirlerine genellikle benzerler ve genel olarak kırılma indisleri yüksektir. Optikçe aktiftirler ve yağların polarize ışığı spesifik olarak çevirmeleri yağı tanıtmaya yarayan önemli özelliklerden birisidir, kırılma indisinde polarize ışığı çevirmede meydana gelen değişimler, yağın saflığının bozulduğunu gösterir. Uçucu yağlardan elde edilen bazı maddelerin doğal ya da yapay yolla elde edildiğini, maddenin polarize ışığı çevirmesini saptamak suretiyle anlamak mümkündür. Uçucu yağlar su ile karışmayan maddeler oldukları halde,

kokularının suya geçmesine yetecek oranda suda çözümlenirler. Petrol eteri, benzen, eter, etanol gibi organik çözümlenirlerde çözümlenirler [10, 94, 96].

Uçucu yağlar kendilerine özel kuvvetli bir kokuya, tada ve renge sahiptirler. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler uçucu yağın kendine özgü kokusunu, tadını ve terapötik özelliğini verir. Uçucu yağlarda farmakognozi yönünden asıl önemli olan bileşikler oksitlenmiş türevlerdir. Genellikle uçucu yağlar yağ asidi-gliserol esteri yapısında olmadığından zamanla acılaşmaz. Genel olarak uçucu yağlar sudan hafiftirler, az bir kısmı sudan ağırdır. Örneğin; tarçın yağı, hardal yağı gibi [10, 94, 96].

Genellikle oda sıcaklığında sıvıdır fakat sıvı olmayan katı olan yağlarda vardır. Uçucu yağlar sabit yağlardan bazı özellikleri ile ayrılabilir. Uçucu yağlar, su buharında sürüklenebilirler, süzgeç kağıdı üzerinde leke bırakmazlar, zamanla acılaşmazlar. Ancak ışık ve hava karşısında bir süre sonra oksitlenir ve reçineleşirler. Yine sulu etanolde çözümlenme özellikleri ile uçucu yağlar sabit yağlardan ayrılabilir [10, 94, 96].

Uçucu yağları tanımak için bitkisel doku kesitlerinde ve drog tozlarında Sudan III boyası kullanılır. Bu boya uçucu ve sabit yağlara turuncu bir renk vermektedir. Kesitler bir süre ısıtıldığında ya da sulu etanol ile yıkandığında yağ damlacıkları kaybolursa uçucu yağ, kaybolmuyorsa sabit yağ olduğu anlaşılmaktadır [10].

Bugüne kadar araştırılan 300 bitki familyasından % 30 'dan fazlasının uçucu yağ içerdikleri anlaşılmıştır. Aromatik bitkilerde uçucu yağ oranı % 0,01 ile % 20 arasında değişkenlik göstermektedir [93].

1.2 Uçucu Yağların Sınıflandırılması

1.2.1 Kimyasal Bileşimlerine Göre

Uçucu yağların kompozisyonunu oluşturan kimyasal maddeleri, terpenik maddeler, aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar ile azot ve kükürt taşıyan bileşikler diye dört grup altında toplayabiliriz.

Günümüzde uçucu yağların yapısında 2000 'den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu gösterilmiş olup, bunların % 90 'ı terpenik maddelerden oluşmuştur. Yapılarında bugün 150 'den fazla monoterpen, 1000 kadar seskiterpen ile diterpenler bulunmuştur. Bunların yanında alkoller (benzil alkol, sinnamik alkol, sitronellol), organik asitler (asetik asit, benzoik asit, sinnamik asit), fenoller (karvakrol, kativol, timol), ketonlar (kafur, karvon, pulegon), aldehitler (benzaldehit, sinnamik aldehit, sitral), esterler (benzil benzoat, bornil asetat, granil asetat), fenol esterleri (anetol, öjenol, safrol), ve diğer bileşikler (sülfür, nitrojen, kumarin) bulunmaktadır. Uçucu yağların kendisine has kokusu ve tadı, terpenlerin oksitlenmesi ile oluşan oksijenli türevlerden ileri gelir [10, 11, 72, 93].

1.2.2 Aromatik Özelliklerine Göre

Uçucu yağlar koku ve tat özelliklerine göre de sınıflandırılabilirler. Buna göre uçucu yağlar; "aromatika" (çok kokulu ve tadı iyi olanlar), "aromatika-aroma" (kokulu ve acı tadı olanlar), "aromatika-acria" (kokulu ve tadı keskin olanlar) diye üçe ayrılır [72].

1.2.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre

Uçucu yağlar farmaside farmakolojik ve terapik etkilerine göre de gruplandırılır. Uçucu yağların nervinatik (sinir yatıştırıcı), rubefiyen (deriyi kızartan), irritan (uyarıcı), ekspektoran (balgam söktürücü), antitussif (öksürüğü

kesen), antiromatizmal, diüretik (idrar söktürücü), emmenagog (adet söktürücü), stomasik (midevi), karminatif (gaz giderici), koleretik (safra sökücü), antihelmintik (solucan düşürücü), antienflamatuar, antiseptik, antibiyotik, antifungal, antioksidant ve sedatif etkilerine göre bir gruplandırmaya tabii tutulurlar [72, 74, 80].

Uçucu yağların çoğu toksik etki gösterir. Mukozayı tahriş eder, sinir sistemini uyuşturur. Toksik etki lipitlerde erimelerinden ve hücre içine girerek plazmayı bloke etmelerinden ileri gelir.

Uçucu yağların birden fazla maddeden oluştuğu dikkate alınır, aynı uçucu yağın değişik amaçlarla kullanılması da doğal sayılır. Bugün uçucu yağlar yerine, daha çok içindeki terpenik veya aromatik etken maddeler ilaç olarak kullanılmaktadır [96].

1.3 Bitkisel Materyalin Hazırlanması

Bilimsel amaçlar için kullanılacak bitkisel materyallerin deneylerden önce kullanım şekillerine uygun yöntemlerle hazırlanmaları gerekmektedir.

Tıbbi bitkilerin drog olarak kullanılan yaprak, çiçek, tohum, kök gibi kısımların içerdiği etkili bileşikler nedeniyle hastalıklara iyi geldiği belirtilmektedir. Bu etkili bileşikler; bitkilerde belirli hayat devrelerinde yapılmakta ve miktarı da belirli zamanlarda en yüksek düzeye erişmektedir. Drogun etkili bileşikler bakımından, mümkün olduğu kadar zengin olması istendiği için, bitkisel materyaller, drog etkili maddelerinin en yüksek olduğu dönemlerde toplanmalıdır. Bu da her drog için özel bir toplama, kurutma, saklama şekli ve zamanı bulunduğunu gösterir [2].

1.3.1 Toplama

Genellikle elle veya küçük aletler (makas) kullanılarak yapılmaktadır. Ayrıca elle toplama sırasında bitkinin ertesi yıl tekrar ürün vermesi için kökleme yapılmamalıdır. Uçucu yağlar sıcak hava ve güneşte buharlaşarak kaybolabileceğinden dolayı bu bitkiler genellikle erken saatlerde toplanırlar. Örneğin; güller sabahleyin ve iyice açmış halde iken, karanfiller 2-3 saat güneşte bekletildikten sonra toplanır. Yapraklar bitki çiçek açmaya başladığı zaman, çiçekler tamamen açılmadan önce veya tomurcuk halinde, toprak altı kısımları bitkinin toprak üstü kısımları kuruduktan sonra, kabuklar bitki yapraklarını döktükten sonra, meyve ve tohumlar özel kayıt yoksa olgunlaştıktan sonra toplanırlar [2, 10, 12].

1.3.2 Kurutma

Toplanan bitkisel materyal, nadiren taze halde kullanılır. Bitkisel materyallerin içerdikleri etkin maddelerin değişime uğraması, bozulması veya yok olmasını önlemek ve her an kullanılabilir bir durumda muhafaza etmek için kurutulmaları gerekmektedir.

Kurutma işlemi sırasında materyal ağırlığının ortalama % 75 'lik kısmını kaybettiği için kurutma materyalin taşınması ve depolanması yönünden de yararlıdır. Kurutma işlemi için seçilecek yol, kurutulacak materyalin cinsine ve taşıdığı etkili maddelerin durumuna göre yapılmalıdır. Yalnız enzimlerin en etkili olduğu sıcaklığın 35 – 50 °C arasında olduğunu düşünerek kurutma sırasında materyalin bu ısıda çok az bir süre kalmamasına özellikle dikkat edilmelidir [2].

1.3.2.1 Güneşte Kurutma

Bitkisel materyal doğrudan doğruya güneşe serilerek kurutulması yöntemidir. Çok ekonomik ve kolay bir yöntem olmasına rağmen güneşe dayanabilen bitkisel materyal için kullanılabilir. Çiçekler için bu yöntem uygun değildir [2].

1.3.2.2 Gölgede Kurutma

Bitkisel materyalin üzeri kapalı ve yanları açık çardak, sundurma veya hangarlar içinde kurutulması yöntemidir. Burada malzeme doğrudan güneşe maruz kalmadan, açık havada kurutulmuş olur. Bitkisel materyal demetler halinde asılır veya ince tabaka halinde yere yada kurutma raflarına serilir ve küflenmeyi önlemek için sık sık alt üst edilir. Yaprak ve çiçek gibi suyunu kolaylıkla kaybeden materyal bu yöntem ile iyi şekilde kurutulur [2].

1.3.3 Saklama

Kurutulmuş olan bitkisel materyalin özelliklerini kaybetmeden, korunması için bazı koşullara uyulması gerekmektedir. Saklama sırasında rutubet, sıcaklık ve ışık drogun bozulmasına sebep olan etkenlerdir. Bunun için genel olarak drogların serin, kuru ve karanlık bir yerde saklanması gerekir. Drog kese kağıdı, bez torba, mukavva kutu, teneke kutu veya cam kavanoz içinde saklanmalıdır. Plastik torbalar drogların muhafazası için uygun değildir kısa sürede küflenmeye neden olur. Kurutulmuş olan droglar, tedavi özelliklerini genellikle bir yıl muhafaza edebilmektedirler. [2].

1.4 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağlar bitkilerden, miktarlarına ve bileşenlerinin özelliklerine bağlı olarak ve diğer bir yonden de uçucu yağ elde edilecek bitki kısmına göre değişik şekillerde elde edilir [72, 93]

1.4.1 Distilasyon Yöntemi

Distilasyon yöntemi, bitki materyallerindeki bütün uçucu maddeleri buharlaştırma ve yoğunlaştırma yoluyla ayırma yöntemidir. Bu yöntem ucuz ve kolay olup uçucu yağı kolaylıkla veren bitkiler için uygulanır [72].

Genellikle çiçekler doğrudan, yapraklar hafif ufalandıktan sonra, kök vs. ise küçük parçalara ayrıştırıldıktan sonra distile edilirler. Bitkiler çok ince toz haline getirilmemelidir. Portakal çiçeği, gül, lavanta, anason, karanfil, nane, kekik, adaçayı gibi bitkilerde bu yöntem uygulanır [72]. Uçucu yağların elde edilmesinde beş tip distilasyon yönteminden faydalanılır.

1.4.1.1 Su Distilasyonu

Kuru bitki materyali distilasyon aygıtı içinde sıcak su ile kaynatılır. Oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaştırılarak bir kapta toplanır. Kapta su ve yağ tabakası ayrılır ve uçucu yağ alınır. Geleneksel olarak uçucu yağ üretiminde kullanılan imbicler ve laboratuvar tipi Clevenger aygıtı bu yöntem için kullanılır [72, 97].

1.4.1.2 Su ve Buhar Distilasyonu

Hem kuru hem de taze bitkisel materyale uygulanabilir. Bu metotta bitki doğrudan doğruya sıcak su ile değil, buharla temas etmektedir. Maserasyona tabi tutulmuş materyalden su buharı geçirilerek uçucu yağlar ayrıştırılır. Su buharı başka bir yerde elde edilir ve bir boru yardımıyla maseratın içine yöneltilir. Yüksek ısı ile parçalanma olasılığı böylece ortadan kalkmış olur. Su buharı ile sürüklenerek soğutucu ünitesine gelen uçucu yağlar yoğunlaşarak toplama kabında birikir [72, 97].

1.4.1.3 Buhar Distilasyonu

Daha çok taze bitki materyallerine uygulandığından ve bu taze materyal yeterince su taşıdığından materyal maserasyona tabi tutulmaz ve distilasyon kazanının ızgarası üzerine konan materyalin içersinden doğrudan sıcak su buharı geçirilir. Basınç ile taze bitki parçalarına yöneltilen buhar, yağ damlacıklarını da beraber sürükleyerek toplama kabına getirir ve toplama kabında biriktirilir [72, 97].

1.4.1.4 Kuru Distilasyon

Bazı droglar kuru kuruya ısıtıldıkları zaman uçucu maddeler kısmen oldukları gibi kısmen de parçalanarak distile olurlar. "Pirojenasyon" adını alan bu işlem özel çelikten yapılmış imbiklerde uygulanır. Materyal odun ya da dal ise küçük parçalar halinde kazanlara doldurulur ve yüksek sıcaklıkta havasız ortamda kuru kuruya distile edilir. Distilasyon ürünleri soğutucudan geçirilerek toplama kabında toplanır [10].

1.4.1.5 Hidrodifüzyon

Bitkisel dokulardaki uçucu yağın bir kısmı yüzeyde bulunurken, bir kısmı da iç kısımlarda bulunur. Yüzeye yakın yerlerdeki uçucu yağ buhar ile almak kolaydır. Yüzeye yakın olmayan bölgelerdeki uçucu yağ ise ancak difüzyon işleminden sonra yüzeye ulaşır.

Hidrodifüzyon işlemi endüstride normal buhar distilasyonunun aksine buharın bitkisel materyal dolu kazana üstten verilmesi ve alttan çıkan buharın yoğunlaştırılması şeklinde uygulanır. Hidrodifüzyonun getirdiği birtakım avantajlar vardır. Özellikle kazanın yüklenmesi ve boşaltılması işlemleri düşünüldüğünde kullanım kolaylığına sahiptir. Sadece düşük basınçta ıslak buhar kullanılır. Distilasyon süresi kısadır, daha az buhar harcandığı için daha az masraflıdır. Distilasyon süresinin kısa olmasından ve riflaks olayı

gerçekleşmediğinden dolayı yağın bileşikleri hidrolize uğramazlar. Üretilen yağların fiziksel özellikleri standart değerlere uygunluk gösterir [93].

1.4.2 Ekstraksiyon Yöntemi

Bitkisel materyalden etken maddeleri elde etmek için çözücüler kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Ekstraksiyon yöntemi kullanılan çözücü maddenin cinsine göre üç farklı şekilde yapılabilmektedir.

1.4.2.1.Organik Çözücü ile Ekstraksiyon

Bitkisel materyal, uçucu yağ kolaylıkla çözebilen benzen, hekzan, petrol eteri, kloroform gibi kaynama noktası düşük organik çözücülerle eritilir. Organik çözücünün alçak basınçta uçurulması ile bir miktar (sabit yağ, boya maddeleri, mum vs.) yabancı madde içeren uçucu yağ elde edilir ki bu karışıma konkret denir. Konkret, önce alkolle muamele edilir ve sonra vakum distilasyonu ile alkol uçurulur Böylelikle absölü (absolute) adı verilen, pahalı ve kullanılması kolay bir yağ elde edilmiş olur [97, 98].

1.4.2.2 Sabit Yağ ile Ekstraksiyon

Uçucu yağ miktarının az olduğu ve diğer distilasyon yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda kullanılır. Bu yöntemde bitkisel materyal bir sabit yağ ile belli bir süre temasta bırakılır. Zamanla uçucu yağ sabit yağa geçer. Bu işlem soğuk yağ veya sıcak yağ ile yapılmaktadır. Özellikle parfümeri endüstrisinde kullanılan bir yöntemdir [97, 98].

1.4.2.3 Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon (SAE: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu)

Gazlar yüksek basınç ve sıcaklık altında yani süperkritik evre bölgesinde bir sıvı gibi çözücü özellik kazanırlar. Bu özellik, basınç ve sıcaklık değişimleriyle istenildiği gibi yönlendirilmektedir. Böylece sıkıştırılmış gazlar, çeşitli yöntemlerle bir çok maddenin taşıyıcı materyallerden fraksiyonlarına ayrılmasında veya madde karışımlarının rafinasyonunda kullanılabilir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilir. Ayrıca SAE hızı, süperkritik akışkanda moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olması nedeni ile yüksektir. Bir süperkritik akışkan, maddenin bastırılabilirdiği ve bir gaz olarak davrandığı halidir. Diğer bir deyişle, kritik sıcaklığının yukarısına ısıtılan ve aynı zamanda kritik basıncının yukarısına bastırılan bir gazdır. Kritik sıcaklığın yukarısında ısıtılan gaz, yavaşça artan basınçla süperkritik akışkanı oluşturur. Süperkritik ekstraksiyonda amonyak, etilen, toluen ve CO₂ genel olarak amaca uygunluk gösterir. Bunlar arasında en çok kullanılan süperkritik akışkan CO₂'dir. Çünkü CO₂, patlama tehlikesi ve toksik etkisi olmayan, bunun yanı sıra oldukça saf ve ucuz elde edilebilen, kimyasallara ve radyoaktif maddelere karşı kararlı, polar olmayan ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücü göstermesi gibi uygun kritik özelliklere sahip bir gazdır. CO₂'nin kritik noktası 73 kg/cm² atm basınçta, 31 °C'dir.

Bu yöntem esas olarak yüksek basınçlı ekstraksiyon kabı içinde sıvılaştırılmış gazın kritik noktası yakınlarındaki sirkülasyonu içerir. Ekstrenin çözücü gazdan ayrılması basıncın değiştirilmesi ile veya tamamen buharlaştırma ile mümkündür. Geri kazanılan gaz sıkıştırılarak yeniden kullanılabilir. Bu üretim sisteminin kurulması yüksek maliyetli olduğundan ancak pahalı ürünlerin eldesinde kullanılmaktadır [10, 99].

1.4.3 Mekanik Yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)

Bazı droglardan distilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edilmek istendiğinde droglardaki uçucu yağ bozulmaktadır. Bu nedenle bu tip droglardan mekanik yöntemle yağ elde edilmektedir. Bu yolla genel olarak portakal, limon, bergamut ve mandalina gibi turunçgil meyve kabuklarından uçucu yağ elde etmeye uygundur. Mekanik yöntemle uçucu yağ elde etmek için preslerde sıkma veya benzeri cihazlar kullanılır. Bu şekilde elde edilen usareler genel olarak berrak değildir. Bu ekstreleri berraklaştırmak için; uygun bir filtreden süzülür santrifüj yapılarak içindeki partiküllerden ayrılır, alkol ilave edilerek veya ısıtılarak bulanıklık yapan maddeler uzaklaştırılır. Bu şekilde soğuk presle uçucu yağ elde edilir [72, 97].

1.5 Uçucu Yağdaki Bileşiklerin Belirlenmesi

Uçucu yağ kompozisyonundaki bileşenler gaz kromatografisi ile kolayca ayrılarak tanınabilir. Gaz kromatografisinde ayırım gerçekleştirildikten sonra kütle spektrometresinde dedekte edilmelidir. Kütle spektrometresi, yüksek duyarlılığı ve tarama çabukluğu ile bir gaz kromatografiden elde edilen çok az miktarda maddelerin yapısı hakkında bilgi edinmek için en uygun yoldur. İki tekniğin birleştirilmesi, doğal ve sentetik organik karışımlardaki bileşenlerin yapı analizi için çok uygun bir yöntem oluşturur.

Ayrırma işlemi, yüzeyi geniş katı bir destek üzerindeki hareketsiz faz ile hareketli faz arasında ayrılması istenen bileşiklerin göç etme hızlarının farklı olmasından yararlanarak yapılır. Hareketsiz fazı üzerinde taşıyan katıya destek katısı, hareketsiz faza durucu faz ve hareketli faza taşıyıcı gaz denir. Kromatografide ayrılması istenen karışım, üzeri durucu fazla kaplanmış destek katısı ile doldurulmuş cam veya metal bir kolondan geçirilerek ayrılma gerçekleştirilir. Ayrılan bileşikler kolonun diğer ucundan farklı zamanlarda çıkar ve uygun bir dedektör ile tespit edilip miktarı ile orantılı olarak kaydedilir. Ayrılmanın gerçekleştiği kolondan çıkan akışkanın toplamına kolon efluenti, bunun hareketli faza ait kısmına eluent ve ayrılmış bileşene ait kısmına eluat denir.

Gaz kromatografisi kütle spektrometresi'nde kolon girişinde bulunan enjeksiyon kısmında, ayrılacak karışım bir enjektör yardımı ile kolonun ön kısmına verilir, burası ısıtılmış durumdadır (en fazla 500°C'ye kadar), karışım burada hemen buharlaşır ve taşıyıcı gaz tüpünden alınan taşıyıcı gaz yarımıyla kolona girer. Kolonda her bileşik durucu fazdan taşıyıcı faza ve taşıyıcı fazdan durucu faza farklı hızlarla geç ederek devamlı taşınırlar ve böylece birbirinden ayrılarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Bu kolondan çıkan gaz karışımından taşıyıcı gaz "Jet ayırıcı sistem" ile uzaklaştırılır. Bu sistemle kolon gazları jet ayırıcının ucundan çıkarken ağır analit molekülleri yüksek momentum kazanır ve bunların yaklaşık %50'si karşı tüpe giderken hafif olan taşıyıcı gaz atomları vakum tarafından emilir. Kolondan gaz elektron bombardımanı ve kimyasal iyonlaşma ile iyonlaştırır ve radyo frekans manyetik alanın da depolanır. Tutulan iyonlar daha sonra elektron çoğaltıcı dedektöre sevk edilir bu sevk kütle/yük oranının taranmasının yapılabilmesi için kontrollü gerçekleşir.

Kütle spektrometrik detektörler genellikle iki tip sinyal görüntüsü verebilirler; anında sinyal görüntüleri ve bilgisayarda yeniden biçimlendirilmiş sinyal görüntüleri. Bu sinyal görüntüleri pikler halinde bilgisayar ekranında gözlenebilir ve cihazdaki bilgi bankası aracılığı ile maddeler tanımlanabilir [100, 101].

1.6 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Uçucu yağların patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesinin varlığının ve derecesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir.

1.6.1 Disk Difüzyon (Kirby- Bauer) Yöntemi

Antimikrobiyal ajanların duyarlılığının saptanmasında günümüzde kullanılan otomize ve yarı otomize teknikler gibi modern işlemlerin yerine, daha önce Kirby-

Bauer tekniği kullanılmaktaydı. Bu yöntem günümüzde yalnız araştırma amacıyla ve özel amaçlar için kullanılmaktadır.

Bu yöntemle; belirli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan süspansiyonun yayıldığı agar plakların yüzeyine yerleştirilir. Böylece diskteki antimikrobiyal madde besiyeri içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı ölçülerek her antimikrobiyal madde için farklı olabilen duyarlılık sınırı değerleriyle karşılaştırılır. İnhibisyon alanının büyüklüğüne göre duyarlı, orta seviyede duyarlı veya dirençli şeklinde duyarlılık kategorisi belirlenir.

1.6.2 Tüp Dilüsyon Yöntemi

Bir dizi tüpe eşit miktarda sıvı besiyeri ve belirli bir antimikrobiyal maddenin seri halde çift kat dilüsyonları konur. Her tüpe test uygulanacak olan organizmanın standart süspansiyonundan eşit miktarda eklenir (yani organizmanın konsantrasyonu sabittir, her tüpteki antimikrobiyal madde miktarı ise değişiktir). Kontrol tüpünde antibiyotik bulunmaz. Süspansiyonlar 24 saat inkübe edilir. Antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, inhibitör konsantrasyonunun altında olduğu tüplerde süspansiyon bulanıktır. Antimikrobiyal madde konsantrasyonu inhibitör düzeye eşit veya daha yüksek olduğu tüplerde ise sıvı besiyeri berraktır. Üremeyi baskılayan en düşük madde konsantrasyonu MİK (Minimum İnhibisyon konsantrasyonu) olarak kabul edilir.

Sıvı besiyerinde sulandırma yöntemleri, tüpte uygulanıyorsa makro (tüp dilüsyon), mikrotitrasyon plaklarında, küçük hacim kullanılarak uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır [102, 103].

1.7 Labiatae (Lamiaceae) Familyasının Genel Özellikleri

Genellikle salgılı ve aromatik tek veya çok yıllık otsular, nadiren çalı ve ağaç formunda bitkiler. Gövde ve dallar dört köşeli veya değildir. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pennat, daima karşılıklı. Çiçek durumu brakte veya floral yaprakların koltuğunda taşınan vertisillastrum şeklindedir. Vertisillastrumlar spika, baş, rasemus veya simoz durumlar şekline düzenlenebilir. Çiçekler hermafrodit veya ginodioik türlerde erkek organlar steril (işlevsel olarak dişi çiçek)'dir. Brakteler yapraklara çok benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir. Kaliks genellikle 3 dişli üst lop ve 2 dişli alt lop olmak üzere genellikle 5 lopludur, nadiren üst ve alt lop bölünmemiş ya da üst lop1 alt lop 4 dişli, bazen kaliks aktinomorf, 5 - 20 arasında damar bulunur. Korolla birleşik, zigomorfik ve iki dudaklı, tüpsü, genellikle üst dudak belirsiz 2 loplulu, dik yada falkat, az çok konkav, alt dudak 3 loplulu, nadiren üst dudak indirgenmiş ve alt dudak 5 loplulu, yada üstte 1 ve altta 4 loplulu yada korolla aktinomorfiktir. Stamenler, korollaya bağlı, 4 ve didiman ya da 2, üstteki çift genellikle alttaki çiftten daha kısa, anter tekaları 2 ya da 1 gözlü, paralel ya da divergent, nadiren konnektiflerin uzaması ile birbirinden ayrılmıştır. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, 4 loplulu, 2 karpelli ve ovüllü, anotrop, plasentasyon bazal veya eksenseldir. Stilus ginobazik, nadiren değil, tepede iki loplulu. Meyve 4 nuksa ayrılan (nadiren daha az) bir şizokarptır.

Angiospermae subdivisio'sunun altıncı büyük familyası olan Labiatae'nin Ülkemizde 45 cinsi ve 546'dan fazla türü bulunmaktadır [104].

1.8 *Thymus* Cinsinin Genel Özellikleri

Aromatik, çok yıllık yastık oluşturan, tabanda odunlu küçük çalimsı ya da sürünücü otsu bitkiler. Gövde tabanda otsu olup üstte dallanma gösterir, dallar sık uzun, enine kesitte dört köşeliden yuvarlağa kadar değişen şekillerde, her tarafı veya karşılıklı iki yüzeyi tüylü. Yaprak ayasının kenarları tam, revolut yada değil, sapsız ya da kısa saplı, çoğunlukla saptan ayanın kenarlarına doğru silli. Yapraklar, brakteler ve kaliks sapsız salgılı (yağ damlacıklı), salgı renksizden koyu kırmızıya kadar değişir. Vertisillatlar floral yapraklarla desteklenen 2 - çok çiçekli, bazen sık

başçık durumunda ya da uzamış ayrı vertisillatlarda. Brakteler yapraklara benzer ya da farklı. Brakteoller genellikle küçük. Kaliks belirgin bilabiata; tüp silindirikten, kampanulata kadar değişen şekillerde, 10 - 13 damarlı, boğaz kısmı sık beyaz tüylü, üst dudak 3 dişli, tüpten geniş, düz yada yukarı doğru kıvrık, dişler dudağın 1/10 - 1/2 'ne kadar, alt dudak dar uzun 2 dişli, dişler subulat, siliat, yukarı doğru kıvrık. Korolla beyaz, yada açık pembeden mora kadar değişen renklerde, tüp şeklinde, kaliksten daha uzun, üst dudak emarginat ±düz, alt dudak 3 loplu. Stamenler 4, hermafrodit çiçeklerde korolladan dışarı çıkar. Anterler birbirine paralel veya divergent tekalı. Nutlet küçük, tüysüz. Bitki genellikle ginodioiktir [104].

1.9 Türkiye'de Yetişen *Thymus* Türleri ve Türkiye'de Bulunduğu yerler

Ülkemizde tamamı çok yıllık olan *Thymus* cinsinin 38 türü kayıtlıdır. Ülkemizde Yetişen bu türler aşağıda liste halinde verilmiştir. Bunlardan endemik olanlar (*) ile belirtilmiştir [105].

- *1. *T. cilicicus* Boiss. & Bal. (Güney batı, Güney Anadolu, Adalar)
- *2. *T. revolutus* Celak. (Doğu Akdeniz)
- *3. *T. pulvinatus* Celak (Marmara Bölgesi)
4. *T. cherlerioides* Vis. (Batı ve Güney Anadolu)
5. *T. parnassicus* Halacsy (Doğu Anadolu)
6. *T. leucotrichus* Hal. (İç ve Güney Anadolu)
- *7. *T. convolutus* Klokov (Doğu Anadolu)
- *8. *T. argaeus* Boiss. & Bal. (İç Anadolu)
- *9. *T. brachyphilus* Jalas (Güney ve İç Anadolu)
- *10. *T. cappadocicus* Boiss. (İç ve Doğu Anadolu)
- *11. *T. haussknechtii* Velen. (Doğu Anadolu)
- *12. *T. pectinatus* Fisch. & Mey. (İç Anadolu)
- *13. *T. canoviridis* Jalas (Doğu Anadolu)
- *14. *T. spathulifolius* Haussk. & Velen. (Doğu Anadolu)
15. *T. eigii* (M. Zohary & P.H. Davis) (Güney Anadolu)
16. *T. syriacus* Boiss. (Gaziantep)

- *17. *T. cariensis* Hub. – Mor. & J alas (Güney Batı Anadolu)
18. *T. atticus* Celak. (Kuzey Batı Anadolu)
19. *T. striatus* Vahl. (Marmara Bölgesi)
- *20. *T. samius* Ronniger & Rech. (Adalar)
21. *T. zygioides* Griseb. (Batı, İç ve Güney Batı Anadolu, Adalar)
- *22. *T. aznavourii* Velen. (Marmara Bölgesi)
23. *T. roegneri* C. Koch. (Kuzey Batı Anadolu)
24. *T. comptus* Friv. (Marmara Bölgesi)
25. *T. fallax* Fisch. & Mey. (İç ve Doğu Anadolu)
26. *T. transcaucasicus* Ronniger (Kuzey Doğu Anadolu)
27. *T. kotschyanus* Boiss. & Hohen. (Güney ve Doğu Anadolu)
28. *T. eriocalix* (Ronniger) J alas (Güney Batı Anadolu)
- *29. *T. fedtschenkoi* Ronniger (Doğu Anadolu)
30. *T. ararati-minoris* Klokov & Shost (Doğu Anadolu)
31. *T. migricus* Klokov & Des. – Shost. (Doğu Anadolu)
- *32. *T. sipyleus* Boiss. (Batı, Güney, İç, Güney Batı ve Kuzey Doğu Anadolu)
- *33. *T. leucostomus* Hausskn. & Velen. (İç ve Kuzey Anadolu)
34. *T. pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak. (Doğu Anadolu)
- *35. *T. bornmuelleri* Velen. (Kuzey Batı Anadolu)
36. *T. praecox* Opiz (Batı, İç, Kuzey, Kuzey Doğu ve Güney Doğu Anadolu)
37. *T. longicaulis* C. Presl (Kuzey, İç, Marmara, Kuzey Doğu, Kuzey Batı, Batı ve Güney Batı Anadolu)
38. *T. pseudopulegioides* Klokov & Des.- Shost. (Kuzey Doğu Anadolu)

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Bitkisel Materyal

Araştırmamızda *Thymus* cinsine ait farklı lokalitelerden toplanan *T. cilicicus* Boiss. & Bal, *T. canoviridis* Jalas tüylü ve tüysüz (I ve II), *T. comptus* Friv, *T. revolutus* Celak'un toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Araziden toplanan bitki örnekleri gölgede ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi gerçekleşikten sonra bitki örnekleri 3 saat süreyle hidrodistilasyona tabi tutularak uçucu yağları izole edilmiştir. Kullanılan türlerin herbaryum örnekleri Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesinde Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan *Thymus* türlerine ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

2.1.1.1 Araştırmada Kullanılan *Thymus* Türlerinin Genel Özellikleri

Thymus cilicicus Boiss. & Bal.

Kısa boylu, sık yastık oluşturan ya da uzun, yarı çalimsı bitkiler, gövde 5 - 40 cm, geriye dönük kısa tüylü, uzun sürgün yaprakları 5 - 12 x 0,5 - 2 mm, sapsız, lanseolat- subulat, düz kenarlı, alt 1/3 'ü sili; yağ damlacıkları seyrek, renksiz ya da sarımsı renkte. Yanal sürgünlerin yaprakları sık, küçük 2 - 4 x 0,3 - 0,5 mm, kenarları belirgin şekilde geriye kıvrık, puberulent-pubescent. Çiçek düzeni kapitat, boyutları 2,5 x 1,5 cm'ye kadar ulaşmakta. Brakte 7,5 - 10 x 3 - 5 mm, ovat, uzun aküminat, puberulent, orta ve 3 - 5 çift yanal damarları oldukça belirgin, alt 1/2 'si silli, yağ damlacıkları yoğun. Brakteol c. 2 mm, silli. Çiçekler çoğunlukla sapsız, bazen 0,5 mm kadar saplı. Kaliks 3,5 - 5,0 mm, dudaklar \pm eşit uzunlukta, tüpten

uzun, üst dudağın orta dişi 0,5 - 0,8 mm, üçgenimsi, düzensiz siliat. Korolla 5 - 9 mm, rengi leylaktan mora kadar değişir, bazen beyaz, dış yüzeyi seyrek, iç yüzeyi sık ya da seyrek tüylü, stilüs seyrek tüylü. Kayalık ya da taşlı yerlerde 70 - 2000 m yükseklikte yetişir. Çiçeklenme dönemi Mayıs ve Ağustos ayları arasındır [105].



Şekil 2.1 *Thymus cilicicus*'un genel görünüşü (Foto B. Yıldız)

***Thymus revolutus* Celak.**

Sürünücü gövdeleri kısmen toprak altında kalan ve toprak üstü kısımları nodyumlardan köklenebilen bitkiler, verimli gövdeler 5 - 20 (-25) cm, dik ya da sürünücü ve uçta yükseltici, villoz tüylü, tüyler gövde çapından uzun. Yapraklar 8 - 13 x 0,5 - 1 (-2) mm, lineer-lanseolat, hafif falkat, nodlardan uzun (gölge formlarında nodlar uzun) kenarları kıvrık, uzun ve kısa tüylü, tabandan uca kadar silli. Yağ damlacıkları çok, portakal renginden koyu kırmızı kadar; yanal yaprak demetleri normal yapraklara benzer ancak daha kısa. Çiçek düzeni yoğun, küresel ya da konik baş şeklinde, 2,5 x 1,5 cm. Brakteler 7 - 12 x 3,5 - 7.5 mm, geniş ovat, aküminat, uca doğru kenarları dışa kıvrık, villoz, kenarlar silli, 3-5 çift belirgin damarlı, sık ve

kırmızı renkli yağ damlacıklı, olgunlukta uç kısımları mor. Brakteoller küçük. Kaliks 4-5 mm, pubescentten villoza kadar değişen tüylü, dudaklar \pm eşit, genellikle tüpten uzun, üst dudağın orta dişi 0,8 mm, silli. Korolla pembeden mora kadar. 5 - 8 mm seyrek tüylü ve zengin yağ damlacıklı. Yetiştirme ortamı kalkerli alanlar ve *P. brutia* orman açıklıklarındır. Deniz seviyesi-900 m yükseklikte bulunurlar. Çiçeklenme dönemi Mayıs- Temmuz aylarındadır [105].



Şekil 2.2 *Thymus revolutus*' un genel görünüşü (Foto B. Yıldız)

***Thymus comptus* Friv.**

Tabanda az odunlu, zengin dallanan bitkiler, çiçekli gövdeler 10 - 15 cm, 4 yüzeyi de patent villoz tüylü, yanal yaprak demetleri mevcut. Yapraklar 8 - 15 x 0,5 - 2,2 mm, lanseolat, lineer-lanseolat, akut, seyrek tüylü, tüyler 1 mm kadar uzunlukta, tabandan 2/3 'ü uzun sili; yağ damlacıkları sık, kahverengimsi, orta damar belirgin; yanal damarlar daha zayıf ve paralel. Çiçek düzeni 5 - 10 cm'ye kadar uzayan, internodyumlar belirgin, yaklaşık 1 cm, vertisillatlar çok çiçekli. Brakteler 4 - 13 x 1,4 - 3,2 mm, internodlara eşit ya da kısa, ovat-lanceolat, yanal damarlar 2 - 3 çift ve belirgin. Brakteoller 4 mm'ye kadar, pediselden uzun, pungent. Kaliks (3-)

3,5 - 5 mm, tp dudaklara eşit, damarlar belirgin, villoz-hirsut; üst dudak, alt dişlere eşit ya da uzun, üst orta diş 1,2 - 1,5 mm, silli. Korolla gl kırmızısı, c. 6 mm. Yetişme ortamı kuru ayrlar ve kumlu alanlardır. Yetişme yüksekliği deniz seviyesi - 200m yükseklikte yetişir. Çiçeklenme dönemi Mayıs ayıdır [105].



Şekil 2.3 *Thymus comptus*'un genel görünüşü (Foto B. Yıldız)

***Thymus canoviridis* Jalas**

Tabanda odunlu, yastık oluşturan bitkiler, iekli gövdeler 2 - 5 (-20) cm, sık, geriye dönük ya da patent puberulent, yanal yaprak demetleri çok. Yapraklar 5 - 6,5 (-10) x 1,2 - 1,4 mm, lanseolattan oblanseolata kadar, subobtusdan akuta kadar değişir, \pm karnos, kısa, tek düze velutinos - tomentos, bazen alt yüzeyde uzun tüyler mevcut, basal siler az ve dşc; yağ damlacığı çok, renksiz ya da sarımsı; orta damar belirgin, yanal damarlar 2 çift, belirgin, bazen belirsiz. iek düzeni sık baş şeklinde, bazen alt 1 - 2 vertisillat ayrı. Brakteler yapraklara benzer. Brakteoller 2 - 3 mm, lineer-lanceolar. Kaliks 2,5 - 3,2 (-5) mm, silindirik, pubescent, ayrıca alt tarafı hirsut, saplı salgılı, tp dudaklardan kısa, üst dudak alt dişlere eşit, üst-orta diş 0,4 - 0,6 (-2) mm, silli. Korolla 5 mm, açık pembe. Yetişme ortamları kalkerli

alanlar, step, taşlı yamaçlardır. 1900 - 2500m yükseklikte yetişirler. Çiçeklenme dönemleri Temmuz - Ağustos aylarıdır [105].



Şekil 2.4 *Thymus canoviridis*' in genel görünüşü (Foto B. Yıldız)

2.1.2 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Çalışmada maya formundaki insan patojeni *Candida albicans* (klinik izolat), *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Escherchia coli* ATCC 25292, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* NRRL 123, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Serratia marcescens* (klinik izolat) bakterileri ve *Alternaria brassicola*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* ve *Penicillum expansum* mikrofungusları kullanılmıştır. Saprotik mikrofunguslar Doç. Dr. Ayşe Dilek Azaz tarafından topraktan izole edilmiştir. Tüm mikroorganizma stokları Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde saklanmaktadır.

***Enterobacter aerogenes*:** *Enterobacter* cinsindeki bakteriler, düz, gram negatif, fakültatif, spor oluşturmayan, çubuk şeklindedir. *Enterobacter aerogenes*,

tabiyatta çok yaygın olan, toprak, su, tahıllar ve aynı zamanda insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan nonfekal koliform bir bakteridir. Fırsatçı patojen özellik göstererek yeni doğan ve prematüre bebeklerde, bağışıklık sistemi zayıf ve baskılanmış hastalarda, idrar yolları, üst solunum yolları, yara ve yanık enfeksiyonları, menenjit olmak üzere çeşitli hastalıklar oluşturur. Son zamanlarda *Enterobacter*'lerin giderek artan oranlarda hastane enfeksiyonları yaptıkları bildirilmektedir. *Enterobacter*'ler sefolosporin ve ampisilin'lere dirençli, karbenisilin ve sefotaksim gibi antibiyotiklere nispeten duyarlıdır [106, 107]

***Escherichia coli*:** Memelilerin ve kuşların bağırsak konuğudur. 2 - 6 µm boyunda, 1,0 – 1,5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak basil şeklinde gram-negatif bakterilerdir. Fakültatif anaerop olup, optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir. İnsan normal bağırsak florasında bulunur ve burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge halinde kaldığı sürece hastalık yapmaz. Normal şartlarda kokuşma (putrifikasyon) / mayalaşma (fermantasyon) dengesinin düzenlenmesinde ve sindirim kanalında özellikle K vitamini olmak üzere birçok vitaminin üretilmesinde rol alır. Normal bağırsak florasında bulunan *E. coli*, herhangi bir nedenle başka dokulara geçme olanağı buldukları takdirde önemli enfeksiyonların oluşmasına neden olabilir. *E. coli*'ye karşı ampisilin, tetrasiklinler, kloramfenikol, sefaloprinler ve amigolikozitler'in değişik şekillerde etkilidir [106, 107].

***Listeria monocytogenes*:** 1 - 2 µm boyunda, tek tek, ikili veya kısa zincir halinde, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, gram-pozitif hareketli bir basildir. Aerob ve fakültatif anaerob özelliklere sahiptir. *L. monocytogenes* doğada çok yaygın olup, toz, toprak, kanalizasyon, çürük bitkiler ve hayvan yemlerinden, süt ürünleri, taze dondurulmuş kanatlı etleri, taze işlenmiş et ürünlerinden izole edilmiştir. Enfeksiyon genellikle fekal yolla bulaşır. Özellikle çiğ meyve ve sebze, çiğ peynir, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri, iyi pişmemiş tavuk, balık ve kırmızı et tüketimi olan kişilerde enfeksiyona rastlanma olasılığı yüksektir. *L. monocytogenes* insanlarda Listeriosis denilen gıda kaynaklı bir hastalığa neden olmaktadır. Listeriosis menenjit, endokarditis, öldürücü septisemi, hamilelerde düşük ve ensefalitis gibi ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Listeriozanın genelde risk grubunu yaşlılar,

bağışıklık sistemi zayıf olan insanlar hamile bayanlar, anne karnındaki ve yeni doğmuş bebekler, oluşturmaktadır [108, 109, 110, 111].

Proteus vulgaris: Gram-negatif, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, üreaz pozitif ve çok hareketlidirler. Bağırsak bakterilerinin genel karakterini gösterirler. İnsan dışkısında, lağım sularında, kokuşmuş proteinli yiyeceklerde yaygın olarak bulunurlar. Hastane ortamında gelişen çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. Ağır ve parçalanmış yaralarda bulunmaları hem enfeksiyonu ağırlaştırır hem de gazlı gangren ve tetanos etkenlerinin üremesini kolaylaştırarak bunların enfeksiyonlarının gelişmesine yol açar. Özellikle yeni doğan bebeklerde göbek kordonu enfeksiyonlarından kaynak bulan septis ve menenjit bazen epidemiler halinde görülebilir. Çoğunlukla insanlarda idrar yolları enfeksiyonlarına bazen de enteritise neden olurlar. *P. vulgaris* neomisin, kanamisin ve gentamisine karşı genellikle duyarlıdır [106, 107, 112].

Pseudomonas aeruginosa: Gram-negatif, katalaz pozitif, aerobik, 2 - 4 µm uzunluğunda basillerdir. Bir veya birden fazla polar konumlu flagelları ile hareketlidir. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla üreyebilen non-fermentatif bir bakteridir. Optimum 37 °C'de üreyebilirler. İnsan ve hayvan bağırsağında bulunmaktadır. *P. aeruginosa* fırsatçı patojen bir bakteri olarak; insanlarda yaralarda, yanıklarda, idrar kanallarında enfeksiyonlara neden olur ve apselere, septisemiye ve menenjite neden olabilir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında gentamisin etkili şekilde kullanılan bir antibiyotiktir [106, 107].

Staphylococcus aureus: Kok şeklinde, gram pozitif, fakültatif anaerop bir bakteridir. Üreme sıcaklığı optimum 37 °C'dir. *S. aureus*, doğada oldukça yaygındır; toz, toprak, çevresel yüzeylerde bulunur. İnsanlar ve hayvanlar başlıca konak yerleridir. *S. aureus*, burun mukozasında, ağız ve nazofarink florasında, insan ve hayvan derisinde bulunmaktadır. Gıdalarda geliştiğinde, ürettiği enterotoksinlerin sebep olduğu besin zehirlenmesine neden olmaktadır. Besin zehirlenmelerinin yanı sıra deri-mukoza lokalizasyonları, sepsisler ve zatüree, osteomyelit, artritis gibi sistem ve organ enfeksiyonlarına sebep olurlar. *S. aureus* bakterilerinin günümüz için en önemli yönleri, kullanılmakta olan kemoterapötik maddelerin birçoğuna hızla

dayanıklılık kazanmaları ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlarına daha sık rastlanmasıdır [106, 107, 112].

Serratia marcescens: 0,5 - 0,8 µm eninde ve 0,9 – 2,0 µm boyunda, hareketli, kapsülsüz, gram negatif ve fakültatif anaerobtur. Doğada yaygın olarak toprak, bitki ve su da bulunurlar. İnsan ve hayvanlarda ise ince barsak ve üst solunum yolu florasında bulunan mikroorganizmalardır. Son zamanlarda gittikçe artan sıklıkta hastane enfeksiyonlarına neden olduğu saptanmıştır. Bu mikroorganizma genellikle immün sistemi zayıf bireylerde, geniş spektrumlu antimikrobik alanlarda, trakeostomi veya katater kullanımına bağlı olarak çeşitli araç gereçlerle hastane enfeksiyonlarına neden olmakta ve endokardit, osteomyelit, yara, idrar ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır [106, 113, 114].

Candida albicans: Fırsatçı ve patojen bir tür mayadır. 2 - 3 x 4 - 6 µm boyutlarında oval şeklidir. Tomurcuklanarak ürerler. *Candida*'lar insan ve hayvan mukozalarında kommensal olarak bulunur. Kandidiyasis denen bir enfeksiyona yol açar. Enfeksiyon genital organlarda, bunun yanında, ağız mukozası ve dilde, vücudun rutubetli olan bölgelerinde, deri katmanlarının olduğu bölgelerde görülür. *C.albicans* enfeksiyonun olduğu bölgeden kan ve lenf yoluyla yayılarak, ulaştığı başka bölgeleri de etkisi altına alabilir. *C. albicans* enfeksiyonu, genellikle direnci zayıflamış, özellikle hücresel bağışıklık sistemi tahrip olmuş hastalarda görülür. Tedavi amacıyla nistatin ve imidazol kullanılır [106, 112, 115].

Alternaria brassicola: Koloni koyu kahverengi siyahımsı ve kadifemsidir. Hifler dallı, önceleri şeffaf, sonra kahverengimsidir. Konidiyoforlar tek veya 2-12 'lik gruplar halinde genellikle basit, dik düz veya dalgalı, bazen genikulat, az veya çok silindirik, tabanda hafifçe şişkin, bölmeli, soluk veya orta derecede zeytinimsi kahverengidir. Konidiler genellikle 20 konidilik zincirler halinde bazen dallı, konidiyafor çeperindeki küçük deliklerden çıkmaktadır. Konidiler düz çeperli silindirik, genellikle uca doğru sivirmekte veya obklavat, taban hücresi yuvarlak hale gelmiş, gaga hemen hemen yok gibidir. Apikal hücre az veya çok dikdörtgen şeklinde veya turunkat bir kozalağa benzemektedir. Konidiler 1-11 arası fakat genellikle 6 'dan az enine bölmeli veya genellikle bölmelerin olduğu yerlerde büzülmeler görülmekte, soluk veya orta derecede yeşilimsi renkte, düz çeperli veya

yaşlılıkta hafifçe siğilli hale gelmektedir. *Alternaria brassicola* Cruciferae yapraklarında parazit olarak bulunabilmektedir [116, 117].

Aspergillus flavus: Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler 10 günde hızla gelişerek 6 - 7 cm çapına ulaşmaktadır. Genellikle ince fakat sıkı yapılı bir misel keçesi oluşturmakta, çoğunlukla düz ancak bazı ırklarında ise radial olarak oluklu ya da beyin kıvrımlıdır. Çoğu ırklarında bol miktarda konidi yapıları gelişir. Genç konidi başları genellikle sarı tonlardadır fakat hızlı bir biçimde parlak koyu sarı - yeşil tonlara kaymaktadır. Koloni altı genellikle renksiz - pembemsi esmer renktedir. Kondiyoforlar kalın çeperli, renksiz, kaba şekilde pürüzlü genellikle 1 mm kısadır. Vesiküller gençken uzamış, daha sonraları ise subgloboz veya globoz olmaktadır. Sterigma tek veya iki seri halinde, aynı ırkta tek bir vesikülde her iki durumda görülebilmektedir. Çoğunlukla konidiler olgunlaştıklarında globoz veya subgloboz, belirgin şekilde pürüzlü veya düz çeperli büyüklükleri ırklar arasında değişkendir. *Aspergillus flavus* yağlı tohumlarda mesela yerfıstığı ihtiva eden birçok hayvan yemi ve insan gıdasında aflatoksin denilen mikotoksini üretmektedirler. Yüksek dozlarda alındığında bu toksin karaciğeri tahrip eder. Düşük dozlarda ise kanserlere sebep olmaktadır. Aflatoksinler, bilinen en güçlü doğal kanserojen maddelerdir [106, 116].

Aspergillus niger: Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler yavaş gelişmekte, 10 - 15 günde oda sıcaklığında 2,5-3,0 cm çapına ulaşmaktadır. Oldukça gevşek-kompakt beyaz-hafif sarı bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genellikle yığınlar halinde toplanmış konidi yapıları vardır. Tipik olarak karbon siyahına yakın renkte veya bazen koyu kahverengimsi siyah renktedir ve koloni yüzeyini dar bir kenar hariç tamamen kaplamaktadır. Koloni altı genellikle renksiz, bazen merkezde soluk sarıdır. Konidi başları tipik olarak büyük ve siyah, önce globoz, daha sonra radyat veya yaşlandığında iki veya daha fazla gevşek - iyi belirlenmiş sütun halinde yarılmaktadır. Konidiyoforlar değişken uzunlukta, çeper düz, nispeten kalın, renksiz ve özellikle üst kısımda kahverengimsi tonlardadır. Vesiküller globoz veya globoza yakındır. Sterigmalar iki seri halindedir. *Aspergillus niger* soğan, sarımsak, incir ve turunçgil meyvelerinde siyah çürüklük etmenidir. *Aspergillus niger* saprofit bir fungustur, hastalık etmeni olarak da zayıf bir patojendir. Olgunlaşmamış ve çatlamış meyvelerde hastalık oluşturmaktadır. Portakal yada incir de hastalık yaralanmış ve

çatlamış meyvelerde görülmektedir. Soğanlarda ise hastalık yaralı olanlarda hızlı gelişmekte, ama bunlarda yaralanma olmadan da kabuklar altında hastalık gelişmektedir [116, 118].

Penicillium expansum: Hifler bölmeli, dar, genellikle 2 - 3 µm eninde, renksiz veya parlak renkli, düzensiz dallanmakta ve yoğun kompakt miselyum oluşturmaktadır. Konidi kenarları genellikle çok belirgindir. Konidiyafolar farklılaşmamış yüzey altı veya havai hiflerden gelişmektedir. Saplar nispeten dar ve ince çeperli, genellikle bir iki bölmeli, bazı türlerde apikal olarak şişkin ancak vesiküller daima 10 µm'den küçük çapta, karakteristik şekilde penisillat dallanmıştır ve "penisillus" denilen yapılar gelişmektedir. Fiyalidler terminal ve kompakt vertisiller halinde, nispeten kısadır. Konidiler bazipetal olarak gelişmekte, genellikle uzun zincirler halinde, tek hücreli, çok küçük, küresel, elipsoid, priform veya apikulat nadiren silindirik kitle halinde gri - yeşil, gri - mavi veya gri nadir olarak kahverengidir. *Penicillium expansum* ekonomik öneme sahip bir çok meyvede (elma, kiraz gibi) mavi küf çürüğü etkenidir [119, 120].

2.1.3 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Besiyerleri ve Standartlar

Mueller Hinton Broth (Merck) (Çift Kuvvet)

Et ekstresi.....	4 gr
Kazein hidrolizatı.....	35 gr
Nişasta.....	3 gr
Distile su.....	1000 ml

Tüplere 10'ar ml paylaştırılarak 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Mueller Hinton Agar (Merck)

Et ekstresi.....	4 gr
Agar.....	12 gr
Kazein hidrolizatı.....	17,5 gr
Nişasta.....	1,5gr
Distile su.....	1000 ml

121 °C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15’er ml dökülmüştür.

Listeria Selektive Agar Base (Oxoid)

Columbia Blood Agar Base.....	39 gr
Aesculin.....	1 gr
Ferrik ammonyum sitrat.....	0,5 gr
Lityum klorid.....	15 gr
Distile su.....	500 ml

27,75 gr Listeria Selektive Agar Base (Oxoid) besiyeri 500 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra 121 °C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine Listeria Selektive Supplement (Oxoid) katılıp 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15’er ml dökülmüştür.

Listeria Selektive Supplement (Oxoid)

Sikloheksimid.....	200 mg
Kolistin sülfat.....	10 mg
Akriflavin.....	2,5 mg
Sefotetan.....	1 mg
Fosfomisin.....	5 mg

İçerisine 5 ml % 70 'lik etil alkol katıldıktan sonra 50 °C' ye kadar soğutulmuş steril Listeria Selektive Agar Base (Oxoid)'e ilave edilmiştir.

Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid)

Tripton soya broth.....	30 gr
Yeast ekstrakt.....	6 gr
Potasyum dihidrojen orthofosfat.....	1,35 gr
Di-sodyum hidrojen orthofosfat.....	9,6 gr
Distile su.....	500 ml

23,5 gr Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid) besiyerine 500 ml distile su ilave edilip hazırlandıktan sonra içerisine Modifiye Listeria Selektive Enrichment Supplement (Oxoid) ilave edilip, tüplere 10'ar ml paylaşılırak 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Modifiye Listeria Selektive Enrichment Supplement (Oxoid)

Nalidiksik asit.....	20 mg
Amfotericin B	5 mg
Acridine.....	7,5 mg

Supplement 2 ml steril distile su sulandırılmıştır ve Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid) besiyerine katılmıştır.

Malt Ekstrakt Agar (Samson ve Pitt, 1985)

Malt ekstrakt toz.....	20 gr
Pepton.....	1 gr
Glukoz.....	20 gr
Agar.....	15 gr
Distile su.....	1000 ml

121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Czapek Dox Agar (Merck)

Sodyum nitrat (NaNO ₃).....	2 gr
Potasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄).....	1 gr
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0,5 gr
Potasyum klorür (KCl).....	0,5 gr
Demir sülfat (FeSO ₄).....	0,01 gr
Sükroz.....	30 gr
Agar.....	20 gr
Distile su.....	1000 ml

121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Sabouraud Dextrose Agar (Merck)

Bacto pepton.....	10 gr
Bacto dekstroz.....	40 gr
Agar.....	15 gr
Distile su.....	1000 ml

121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Sabouraud Dextrose Broth (Merck)

Bacto pepton.....	10 gr
Bacto dekstroz.....	40 gr
Distile su.....	1000 ml

Tüplere 10'ar ml paylaşırılarak 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

McFarland No:0.5 Bulanıklık Standardı

BaCl₂ (%1.175).....0,5 gr
H₂SO₄ (0.36N).....99,5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karışımı 15 ml'lik kapaklı tüplere dağıtılmış, kapağı parafilm ile sıkıca kapatılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

2.2 Metot

2.2.1 Uçucu yağların Bileşenlerinin Belirlenmesi

2.2.1.1 Gaz Kromatografisi

Analiz koşulları

Sistem	: HP 6890 GC
Kolon	: HP-5 MS (30 m x 0.25mm <i>i.d.</i> 0.25 µm)
Dedektör	: FID (Alev İyonlaşmalı Dedektör)
Taşıyıcı gaz	: Helyum (1.4ml/dk)
Split oranı	: 1:100
Sıcaklık Programı	: 55 °C-5 dk// 2 °C /dk // 210 °C -10 dk

2.2.1.2 Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS)

Uçucu yağ içindeki bileşenler, gaz kromatografisi kolonundan ayrıldıktan sonra dedektör görevi gören kütle spektrometresinde her birinin tek tek spektrumları alınmıştır.

Analiz koşulları

Sistem	: Hewlett- Packard 5970A
Kolon	: HP-5 MS (%95 dimetil polisiloksan, HP-19091S-433), (30mx 0.25µm <i>i.d.</i> x0.25µm)
Sıcaklık Programı	: 55 °C-5 dk// 2 °C /dk // 210 °C -10 dk
Enjektör	: Otomatik enjektör HP 18593B
Taşıyıcı gaz	: Helyum (1.4ml/dk)
Dedektör	: HP Kütle Seçici Dedektör (Mass Selective Detector, MSD)

Split oranı : 1/100
Elektron enerjisi : 70 eV
Kütle Aralığı : 10-400 u

Kütüphane: Wiley ve NBS kütüphane Tarama Yazılımları

Hekzan çözücüsü içine alınan örnekler cihaza otomatik olarak enjekte edildi (HP 18593B). GC/MS Sıcaklık programı ise 55 °C'de 5 dakika tutulup, 210 °C'ye 55 dakika da çıkması ayarlandı ve bu sıcaklıkta 10 dakika tutularak analiz süresi 65 dakikada tamamlanmıştır.

Analiz sonuçları Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi'nin kütüphanesinde (Wiley ve NBS) bulunan uçucu yağların verileri ile örneklerimizdeki uçucu yağların karşılaştırılması ile tanımlama yapılarak değerlendirildi. Uçucu yağlar tespit edildikten sonra pik alan yüzdeleri hesaplanarak, yüzde bileşimleri tespit edildi.

2.2.2 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Uçucu Yağların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde Agar Disk Difüzyon ve Mikrobroth Dilüsyon teknikleri kullanılmıştır [121, 122].

2.2.2.1 Agar Disk Difüzyon Metodu

Çalışmada kullanılmak üzere steril petrilere 15'er ml olacak şekilde *Listeria monocytogenes* için Listeria Selektive Agar Base (LSA), patojen maya olan *Candida albicans* için Sabraud Dextrose Agar (SDA) ve diğer mikroorganizmalar içinde Mueller Hinton Agar (MHA) dökülerek petrilere düz bir zemin üzerinde donmaya bırakılmıştır. Kullanılacak mikroorganizmalardan *Listeria monocytogenes*, Buffered Listeria Enrichment Broth Base (BLEB) içersinde 35 °C'de, *Candida albicans*, Sabraud Dextrose Broth (SDB) içersinde 37 °C'de ve diğer mikroorganizmalarda

çift kuvvet Mueller Hinton Broth (MHB) içersinde 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda gelişen mikroorganizmalar buldukları tüpten alınarak Mc Farland No:0,5’e (yaklaşık 10^8 CFU/ml) göre bulanıklık ayarı yapılmıştır. Test edilecek uçucu yağlar, her birinden 4 mg olmak üzere ayrı ayrı steril tüplere tartılmış ve üzerlerine 2’şer ml saf Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek tamamen çözümleri, homojen bir karışım haline gelmeleri sağlanmıştır (stok çözelti). Mc Farland No:0,5’e göre ayarlanan taze mikroorganizma süspansiyonlarından uygun besiyerlerine yayma ekim yapıldı ve üzerilerine her birine stok çözültiden 20 µl emdirilen 3 adet ve 20 µl standart kloramfenikol (*Candida albicans* için ketokonazol) emdirilen 1 adet 6 mm çapında steril kağıt diskler uygun aralıklarla yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petri kapları her bir mikroorganizma için uygun inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübe edildi.

2.2.2.2 MikrobrotH Dilüsyon Metodu

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan *Listeria monocytogenes*, Buffered Listeria Enrichment Broth Base (BLEB) içersinde 35 °C’de, *Candida albicans*, Saboraud Dextrose Broth (SDB) içersinde 37 °C’de ve diğer mikroorganizmalarda çift kuvvet Mueller Hinton Broth (MHB) içersinde 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişen kültürler, Mc Farland No: 0,5 ’e (yaklaşık 10^8 CFU/ml) göre bulanıklık ayarı yapılmıştır. Test edilecek uçucu yağlar, her birinden 4 mg olmak üzere ayrı ayrı steril tüplerde tartılmış ve 2 ’şer ml steril saf Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek çözümleri ve homojen bir karışım haline gelmeleri sağlanmıştır. Stok çözelti denemeler için 96 “U” tipi kuyucuklara sahip mikrodilüsyon petrileri (96 Well Plate) kullanılmıştır. Mikropipet yardımıyla kuyucuklara önce 100 ’er µl steril distile su ilave edilmiştir (1, 11, 12’inci sütunlar hariç). Daha sonra ilk sütundaki kuyucukların her birine hazırlanan stok çözültülerden 200 ’er µl konulmuştur. Bu sütundan alınan 100 µl ’lik kısımlar ikinci sütuna transfer edilmiş ve bu şekilde seri olarak yapılan dilüsyonlar ile stok solüsyonların seyreltilmeleri sağlanmıştır. Yalnızca mikroorganizmasız antimikrobiyal ajanların seri dilüsyonlarını içeren sondan bir önceki sütun (11 ’inci sütun) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Son sütun ise pozitif kontrol olarak

bakteriler için bir antibiyotik olan kloramfenikol, *Candida albicans* için ise standart antifungal madde olan ketakonazol kullanılmıştır. Bu işlem tüm kuyucuklara uygulandıktan sonra mikroorganizmaların eklenmesi işlemine geçilmiştir. Bunun için önceden bulanıklığı Mc Farland No: 0,5 'e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri yarım saat 37 °C'de bekletilerek her satıra bir mikroorganizma gelecek şekilde (11 'inci sütun hariç) 100 'er µl ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra mikrodilüsyon petrilerinin kapakları kapatılarak uygun inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar da üremenin varlığı yada yokluğunun tespit edilebilmesi amacıyla mikrodilüsyon petrileri üzerine tetrazolium violet çözeltisi püskürtülmüştür. Bu işlemin sonunda renklenmenin olması için 37 °C 'de 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda renklenmenin olmadığı ilk kuyucukların sahip olduğu konsantrasyonlar MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak değerlendirilmiştir. MİK değeri, antimikrobiyal maddenin mikroorganizmaların üremesini durdurmak için gerekli en düşük konsantrasyon değeri olarak ifade edilebilir.

2.2.2.3 Antifungal Aktivite

Antifungal aktivite çalışmaları içinde agar disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Konidi elde edebilmek amacıyla saprofitik funguslardan *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum* Czapek Dox Agar (CDA) besiyerinde ve *Alternaria brassicola* Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde, 90 mm çapında petri kapları kullanarak 25 °C'de 7 - 10 gün süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra iğne yardımıyla gelişmiş kolonilerden sporlar alınarak, Czapek Dox Agar ve Malt Ekstrakt Agar besiyeri içeren petri kaplarının merkezine uygulanmıştır. Her birine stok çözeltiden 20 µl emdirilen diskler, ekim yapılan noktaların üstüne yerleştirilmiştir. Petri kapları 7 gün süresince 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, uçucu yağların fungus sporlarından gelişen koloniler üzerindeki % inhibisyon değerleri; % **İnhibisyon** = 100.(C-T)/C formülüne göre hesaplanmıştır [123].

C: Kontrol petrisinde gelişen fungusun koloni çapı,

T: Test petrisinde gelişen fungusun koloni çapı

3. BULGULAR

3.1 Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonları

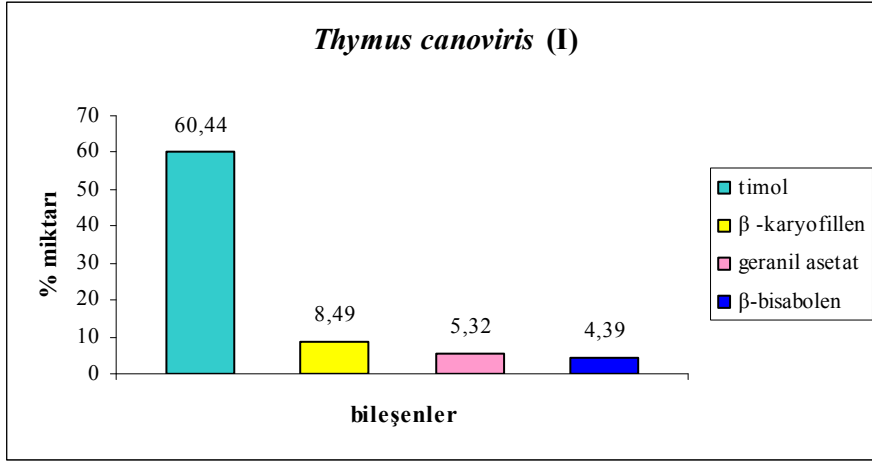
Araştırmamızda kullandığımız *Thymus* türlerine ait uçucu yağların, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Analizi kullanılarak belirlenen kimyasal bileşenleri Tablo 3.1 ve ana bileşenleri de Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5' de grafikler halinde gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan *Thymus* türlerine ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri

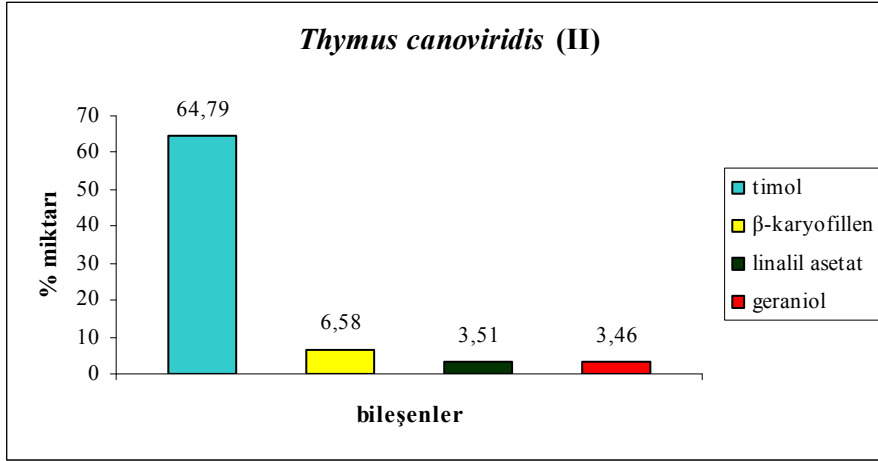
Tür Adı	<i>Thymus canoviridis</i> (I) (tüylü)	<i>Thymus canoviridis</i> (II) (tüysüz)	<i>Thymus cilicicus</i>	<i>Thymus comptus</i> .	<i>Thymus revolutus</i>
Toplayıcı No	B.Y.15832a	B.Y.15832b	T.D.3075	B.Y.16204	T.D.3072
Lokalle ve Toplama Zamanı	Erzincan: Otlukbeli Dağı, Boru hattı çevresi 1700m 08.08.2004	Erzincan: Otlukbeli Dağı, Boru hattı çevresi 1700m 08.08.2004	Muğla: Muğla - Köyceğiz arası, 5.km 100m 13.06.2005	Çanakkale: Gelibolu Keşan arası, 38. km 15m 21.06.2005	Antalya: Manavgat – Serik arası, 19.km quercus çalılıkları arası 20m 13.06.2005
Yağ Verimi (%)	% 0.33	% 0.61	% 0.71	% 1.20	% 1.50
Bileşenler	Rt				
α -thujen	5,94	0,49	1,25	0,57	1,10
α -pinen	6,19	0,78	1,45	1,09	1,84
kamfen	6,78	0,38	5,48	1,13	2,50
β -pinen	7,95	0,27	2,65	0,41	0,33
mirsen	8,86	0,28	0,36	0,73	0,45
α - terpinen	10,04	0,53	1,37	0,83	0,77
<i>p</i> -simen	10,86	1,89	0,84	9,84	2,35
1,8-sineol	11,02	2,03	6,54	4,59	5,64
trans- β -osimen	12,05	-	0,45	0,94	-
γ -terpinen	12,42	1,22	2,58	7,14	8,13
linalool	15,56	2,40	2,85	0,09	-
kamfor	17,56	2,46	7,57	0,24	-
terpinen-4ol	20,14	-	0,59	-	1,00

Tablo3.1' in Devami

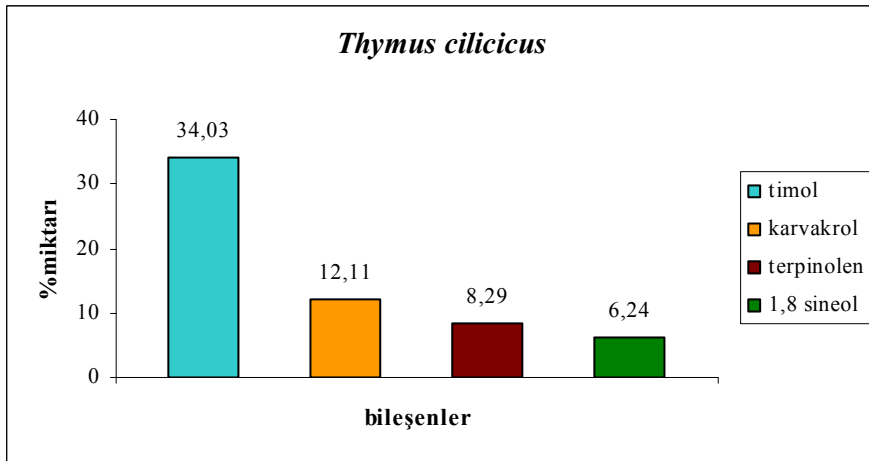
terpinolen	20,93	0,88	-	8,29	0,32	-
borneol	22,89	0,49	-	0,35	0,08	0,67
linalil asetat	24,89	-	3,51	0,65	-	-
geraniol	27,43	2,97	3,46	-	-	-
timol	28,16	60,44	64,79	34,03	55,14	66,96
karvakrol	28,26	0,88	0,22	12,11	6,44	10,12-
geranil asetat	29,64	5,32	1,60	-	-	0,22
β -bourbonen	29,98	0,52	-	-	0,27	-
β -karyofillen	30,95	8,49	6,58	1,70	0,46	5,35
β -kubeben	31,10	0,37	-	-	0,21	-
allo aromadendren	31,38	0,41	0,41	0,97	0,19	0,56
α -humulen	31,77	-	0,29	-	-	0,18
α -amorfen	32,52	0,35	0,21	0,55	0,15	-
germakren-D	32,61	0,82	0,53	0,55	1,92	0,25
β -bisabolen	33,04	4,39	2,63	-	6,74	-
Δ -kadinen	33,83	0,51	0,68	1,83	0,48	1,25
geranil butirat	34,82	0,33	0,58	-	-	-
Spathulenol	35,36	0,83	0,84	2,83	-	-
karyofillen oksit	35,54	1,49	0,94	2,17	-	0,45



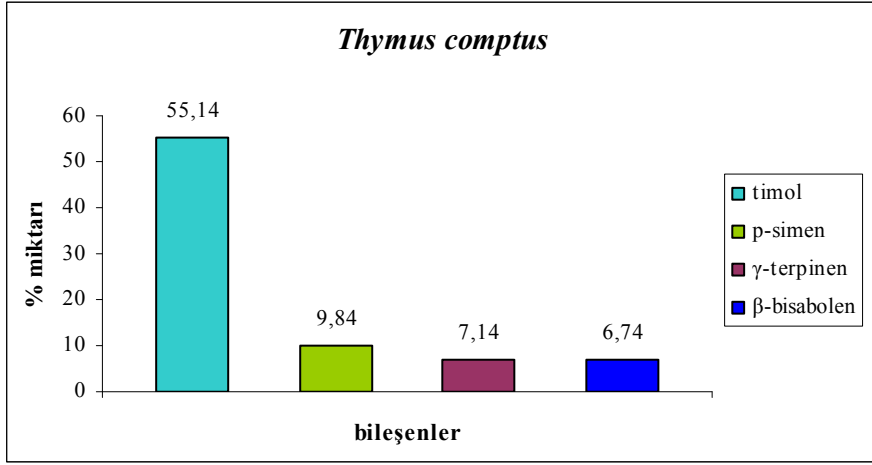
Şekil 3.1 *Thymus canoviridis* (I) uçucu yağının bileşenleri



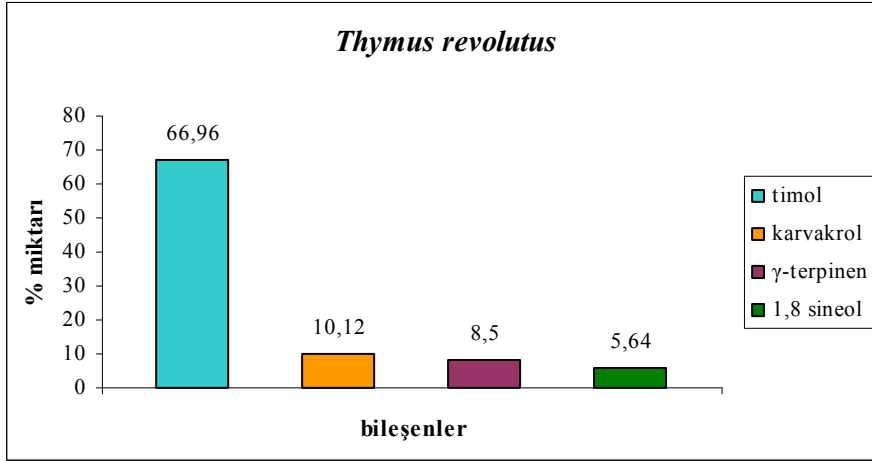
Şekil 3.2 *Thymus canoviridis* (II) uçucu yağının bileşenleri



Şekil 3.3 *Thymus cilicicus* uçucu yağının bileşenleri



Şekil 3.4 *Thymus comptus* uçucu yağının bileşenleri



Şekil 3.5 *Thymus revolutus* uçucu yağının bileşenleri

3.2 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Araştırmamız sırasında bitki örneklerinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon metoduyla elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde Disk Difüzyon, Mikrodilüsyon ve Fungal Spor İnhibisyon metotları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen değerler sırasıyla Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de verilmiştir:

Tablo 3.2 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının Disk Difüzyon Metoduna Göre Antimikrobiyal Aktiviteleri (mm)

Mikroorganizmalar	Kaynak	A	B	C	D	E	Standart
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567	10	10	11	11	10	22 ^C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25292	10	10	11	10	10	22 ^C
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	9	9	9	9	8	24 ^C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	10	10	10	11	9	23 ^C
<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL 123	9	9	8	7	9	24 ^C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	11	11	11	10	11	22 ^C
<i>Serratia marcescens</i>	Klinik izolat	9	9	9	7	8	24 ^C
<i>Candida albicans</i>	Klinik izolat	9	8	7	6.5	7	27 ^K

A: *T. canoviridis* I

B: *T. canoviridis* II

C: *T. cilicicus*

D: *T. comptus*

E: *T. revolutus*

^C: kloramfenikol

^K: ketakonazol

Tablo 3.3 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının Mikrodilüsyon Metoduna Göre Antimikrobiyal Aktiviteleri (MİK) (µg/ml)

Mikroorganizmalar	Kaynak	A	B	C	D	E	Standart	DMSO
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567	250	250	125	125	250	- ^C	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25292	250	250	250	250	250	- ^C	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	1000	1000	500	500	1000	- ^C	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	250	250	250	250	250	- ^C	+
<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL 123	500	250	500	500	500	- ^C	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	125	125	125	125	125	- ^C	+
<i>Serratia marcescens</i>	Klinik izolat	500	250	500	500	500	- ^C	+
<i>Candida albicans</i>	Klinik izolat	500	500	500	1000	500	- ^K	+

A: *T. canoviridis* I

B: *T. canoviridis* II

C: *T. cilicicus*

D: *T. comptus*

E: *T. revolutus*

^C: kloramfenikol

^K: ketakonazol

-: bulanıklık yok (aktivite var)

+: bulanıklık var (aktivite yok)

Tablo 3.4 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının Antifungal aktiviteleri (% inhibisyon Değerleri)

Mikrofunguslar	A	B	C	D	E	Standart
<i>Alternaria brassicola</i>	8	6	5	0	10	78 ^K
<i>Aspergillus flavus</i>	7	16	0	0	0	83,63 ^K
<i>Aspergillus niger</i>	30	28	8	25	15	40 ^K
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	0	9	0	65 ^K

A: *T. canoviridis* I

B: *T. canoviridis* II

C: *T. cilicicus*

D: *T. comptus*

E: *T. revolutus*

^K: ketakonazol

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Araştırmada farklı lokalitelerden toplanan *T. canoviridis* (I ve II), *T. cilicicus*, *T. comptus* ve *T. revolutus* olmak üzere dört türe ait 5 bitki örneği ile çalışılmıştır. Bu örneklerin uçucu yağları, bitkisel materyalin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilerek GC ve GC/MS ile uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri belirlenmiş ve örneklerin lokaliteleri, uçucu yağ verimleri ve yağların kimyasal bileşenleri, Tablo3.1' de verilmiştir.

Araştırmada kullanılan *Thymus* türlerinin uçucu yağ verimlerinin % 0,33 - 1,5 arasında değişen miktarlarda olduğu saptanmıştır (Tablo 2.1). Çeşitli çalışmalarda ülkemizde yetişen 51 *Thymus* taksonuna ait 181 örneğin uçucu yağ verimleri ve bileşenleri saptanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda uçucu yağ veriminin türlere göre % 0,01 - 3,4 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bu örneklerden yağ verimi % 0,01 'den az olanlar zayıf; % 0,01 - % 1 arasında olanlar orta; % 1 'den fazla olanlar ise uçucu yağ verimi bakımından zengin olarak sınıflandırılmışlardır [105]. Buna göre çalışmamızda *Thymus canoviridis* (I ve II), ve *T. cilicicus*'un yağ verimleri sırasıyla % 0,33, % 0,61 ve % 0,71 olarak belirlendiğinden orta; *T. comptus* (% 1,2) ve *T. revolutus* (% 1,5)'un ise yağ verimi bakımından zengin olduğu belirlenmiştir..

GC/MS sonuçlarına göre; Erzincan Otlukbeli Dağı, BTC Boru hattı çevresinden toplanan *T. canoviridis* (I ve II)'nin uçucu yağlarının bileşenleri incelendiğinde her iki örneğin de ana bileşenlerinin timol ve β -karyofillen olduğu saptanmıştır. *T. canoviridis* I' de timol % 60,44, β -karyofillen % 8,49; *T. canoviridis* II' de ise timol % 64,79 ve β -karyofilleninin ise % 6,58 olduğu belirlenmiştir. Daha önce Başer ve arkadaşları (1998) ise Çaykara-Aşkale arasından topladıkları *T. canoviridis* uçucu yağının ana bileşenlerinin karvakrol (% 29,51), geraniol (% 13,25) ve timol (% 9,49) olduğunu rapor etmişlerdir [124].

Diğer örneğimiz olan *T. cilicicus* ise Muğla-Köyceğiz arası 5.km'den toplanmış ve uçucu yağ kompozisyonu incelendiğinde ana bileşenlerinin timol (% 34,03), karvakrol (% 12,11) ve terpinolen (% 8,29) olduğu belirlenmiştir. Tümen ve arkadaşları (1994) İçel Silifke kalesi civarından topladıkları *T. cilicicus* uçucu yağının ana bileşenlerini α -pinen (% 16,74) ve 1,8 sineol (% 10,39) olarak rapor etmişlerdir [125]. Akgül ve Özcan (1999) ise aynı türle yaptıkları çalışmada uçucu yağın ana bileşenlerini α - terpineol (% 16,4) ve kamfor (% 9,7) olarak rapor etmişlerdir [126].

Gelibolu-Keşan arası 38. km' den toplanan *T. comptus* örneğinde ise ana bileşenlerin % 55,14 ile timol, % 9,84 ile *p*-simen ve % 7,14 ile γ -terpinen olduğu belirlenmiştir. Tümen ve arkadaşları da Tekirdağ ve Kırklareli'nden topladıkları *T. comptus* örneklerinin ana bileşenlerinin sırasıyla % 36 ve % 50 oranlarıyla timol olduğunu belirlemişler [81].

Manavgat-Serik arası, 19.km' den toplanan *T. revolutus* uçucu yağının ana bileşenlerinin ise % 66,96 ile timol, % 10,12 ile karvakrol ve % 8,13 ile γ -terpinen olduğu saptanmıştır. Tümen ve arkadaşları Antalya'dan topladıkları aynı türle yaptıkları çalışmada ise uçucu yağın ana bileşenlerini *p*-simen (% 39) ve borneol (% 12) olarak tespit etmişlerdir [81].

Literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında test edilen uçucu yağların ana bileşenlerinde bizim bulgularımızla paralellik olmakla birlikte bazı farklılıkların da olduğu görülmektedir. Çeşitli çalışmalarda uçucu yağların kimyasal kompozisyonu ve miktarları üzerinde bitkilerin, genotip, kemotip, coğrafik orijin, çevre ve toprak şartları ile toplanma zamanının etkili olduğu rapor edilmiştir [127, 128, 129].

Araştırmada kullanılan tüm bitki örneklerinden elde edilen uçucu yağların, agar disk difüzyon ve mikrodilüsyon metotları kullanılarak test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkileri de araştırılmıştır. Agar disk difüzyon metodunda, 6 mm çapında boş antibiyogram disklerine uçucu yağların stok solüsyonlarından 20 μ l emdirilmiş ve oluşan zon çapları mm olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızda oluşan zon çapları kontrol olarak kullanılan kloramfenikol ve ketokonazol'e ait zonlarla

karşılaştırıldığında daha küçük olmasına karşın (6,5–11 mm) test mikroorganizmaları üzerinde tüm uçucu yağların antibakteriyel ve antikandidal etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Tablo 3.2). Baudoux yaptığı bir çalışmada kullanılan diskler etrafındaki üremenin olmadığı zonun ölçüsü 2 - 3 mm arasında ise uçucu yağın bakterisidal etkisinin iyi, bu zon 3 milimetreden büyükse çok etkili, eğer üremenin görülmediği alan hiç yoksa aktivitenin olmadığını rapor etmiştir [130]. Buna göre araştırmamızda test edilen tüm uçucu yağların test bakterileri üzerinde çok etkili oldukları söylenilebilir.

Mikrodilüsyon metodu kullanarak uçucu yağların MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri de belirlenmiştir. Bu değerler Tablo 3.2' de µg/ml olarak verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *T. comptus* hariç tüm uçucu yağlar *C. albicans*'ı 500 µg/ml değer ile inhibe etmişlerdir. *Staphylococcus aureus* 125 µg/ml'lik değer ile tüm test materyalleri tarafından inhibe edilirken, *Proteus vulgaris* ve *Serratia marcescens* en iyi *T. canoviridis* (II) tarafından 250 µg/mldeğer ile inhibe edilmiştir. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde ise tüm uçucu yağlar 250 µg/ml değer ile etkili olmuşlardır. *Enterobacter aerogenes* üzerinde ise *T.comptus* ve *T. cilicicus* 125 µg/ml, diğer uçucu yağlar ise 250 µg/ml değer ile etkili olmuşlardır. *Listeria monocytogenes*'de *T. comptus* ve *T. cilicicus* tarafından 500 µg/mldeğerde inhibe edilmiştir (Tablo 3.3).

Araştırmamızda elde ettiğimiz antifungal aktivite çalışmaları incelendiğinde de *T. canoviridis* (I) uçucu yağının *Aspergillus niger*' in gelişmesi üzerinde % 30' luk inhibisyon değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu oran tüm antifungal aktivite sonuçları incelendiğinde en yüksek yüzde inhibisyon değeri olarak belirlenmiştir. *Aspergillus flavus* ' un gelişmesi üzerine *T. canoviridis* (I ve II) sırasıyla % 7 ve % 16 oranlarında etkili olurken diğer üç test materyalinin bu fungus üzerinde inhibe edici etkilerinin olmadığı saptanmıştır. *Alternaria brassicola*' nın gelişmesi üzerinde *T. revolutus* % 10, *T. canoviridis* (I ve II) % 8 ve % 6 ve *T. cilicicus* ise % 5 oranlarında etkili olmuşlardır. *T. comptus* ise aynı fungus üzerinde etkisiz bulunmuştur (Tablo 3.4).

Test materyallerine karşı en dirençli fungusun *Penicillium expansum* olduğunu söyleyebiliriz. *T. comptus* uçucu yağı bu fungus üzerinde % 9 'luk inhibisyon etkisi gösterirken diğer dört örneğin ise antifungal aktivitesi tespit edilememiştir (Tablo 3.4)

Çok sayıda araştırmada *Thymus* uçucu yağlarının güçlü antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir [24, 60, 131, 132, 133, 134, 135].

Azaz ve arkadaşları *Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*, *T. zygoides* var. *lycaonicus*, *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* ve *T. pulvinatus* türlerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel, antikandidal ve antifungal aktivitelerini incelemişler ve *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* ve *Candida albicans* karşı uçucu yağların etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Antifungal aktivite sonuçlarına göre de *T. zygoides* var. *lycaonicus* uçucu yağının *Mucor hiemalis* sporlarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği fakat *Penicillium clavigerum* ve *Absidia glauca* üzerinde etkili olmadığını rapor etmişlerdir [136].

Delespaul ve arkadaşları çeşitli uçucu yağların antifungal aktivitelerini incelemiş, farklı funguslar üzerine uygulanan yağlardan oldukça iyi sonuçlar aldıklarını belirtmişlerdir. Özellikle *Thymus vulgaris* uçucu yağının orta derecede MİK değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [137].

Dorman ve Deans uçucu yağ bileşenlerinin bu yağların antimikrobiyal aktivite özellikleri ve etki mekanizmaları üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir [11]. Ayrıca birçok bitki türünden elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği araştırmalarda gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir [55, 57, 138, 139, 140]. Bazı araştırmalarda Gram negatif bakterilerin gram pozitiflerden farklı olarak hidrofobik bileşiklerin difüzyonunu kısıtlayan bir dış zara sahip olmaları, bu bakterilerin uçucu yağların antibakteriyel etkilerine karşı daha az hassas olmalarının nedeni olarak gösterilmiştir [17, 141]. Buna karşılık Deans ve arkadaşları bakterilerin uçucu yağlara karşı hassasiyeti üzerinde gram reaksiyonlarının çok az

etkili olduğunu belirtmişlerdir (19, 142). Bizim araştırmamızda gram pozitif ve gram negatif bakterilerin, test edilen *Thymus* uçucu yağlarına karşı duyarlılıklarında büyük bir farklılık saptanmamıştır.

Çalışmada kullandığımız *Thymus* türleri uçucu yağlarının GC ve GC/MS sonuçlarına göre belirlenen ana bileşenlerinin fenolik monotерpenler, monotерpen hidrokarbonlar, oksijenik monotерpenler, aromatik hidrokarbonlar ve seskiterpenler olduğu belirlenmiştir.

Cosentino ve arkadaşları aromatik hidrokarbondan *p*-simen, monotерpen hidrokarbonlardan α pinen ve γ -terpinen, oksijenik monotерpenlerden α -terpinoel ve linalool ve fenolik monotерpen olan timol ve karvakrol ile yaptıkları araştırmada karvakrol ve timol'ün, denenen bileşikler içerisinde en kuvvetli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir [60]. Genellikle yüksek oranda timol ve karvakrol gibi fenolik bileşikler içeren uçucu yağların güçlü antimikrobiyal özellik gösterdiği çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir [11, 60]. Timol ve karvakrol birbirinin izomeridir ve aralarındaki fark hidroksil grubunun pozisyonudur [61, 70, 138] Lambert ve arkadaşları yaptıkları araştırmada timol ve karvakrol'un hücre membran permabilitesini arttırdıklarını tespit etmişlerdir [138]. Karvakrol'un antimikrobiyal aktivitesinin mekanizması üzerine bir araştırma sonucuna göre de karvakrol'e maruz bırakılan hücresel membranlar potasyum iyonlarına ve protonlarına karşı geçirgen hale gelmektedir. Bundan dolayı hücresel iç ortamın pH'sı düşmekte ve membran potansiyeli dağılmaktadır. Sonuç olarak ATP sentezlenememekte ve hücre ölümü meydana gelmektedir [69, 143]. Benzer yapıda olan karvakrol ve timol'ün, hidroksil grubu taşıdıklarından ve yapılarında delokalize elektronlar bulunduğundan dolayı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yapılan bir araştırmada rapor edilmiştir [69].

Timol'ün antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* ve *Candida albicans* üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [8, 11, 60]. Bu sonuçlar,

araştırmamızda test edilen ve ana bileşenleri timol olan uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini açıklamamıza yardımcı olmaktadır.

Terpenik bileşenlerin mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla beraber bazı çalışmalara göre terpenik bileşenlerin hidrofobik özelliklerine dayanarak stoplazmik membrana zarar verdiği, hücre içeriğini pıhtılaştırdığı ve proton pompasını bozduğu düşünülmektedir [144].

Ulte ve arkadaşları hidrofobik yapıda ve aromatik hidrokarbon bir bileşik olan *p*-simen'in stoplazmik membranda genişlemeye ve şişmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir [69]. Başka bir araştırmada da *p*-simen'in timol ve karvakrol'ün aktivitesi üzerinde sinerjik etki yaptığını belirtilmektedir [143].

Yapılan çok sayıda araştırmada 1,8 sineol, *p*-simen, α pinen, kamfor, γ -terpinen, borneol'ün antimikrobiyal aktivite özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir [8, 60, 140, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151]. Bu durum bizim çalışmamızda yüksek oranda 1,8 sineol içeren tüm test materyallerinin ve γ -terpinen içeren *T.comptus* ve *T. revolutus* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin sebebini açıklamamıza katkı sağlamaktadır.

Mevye ve arkadaşları uçucu yağların kimyasal kompozisyonunu oluşturan tek bir bileşenin bile uçucu yağların antimikrobiyal etkisinin değişiminde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir [144].

Çeşitli çalışmalarda, uçucu yağların ana bileşenlerine göre antimikrobiyal aktivite gösterdikleri rapor edilmekle birlikte minor bileşenlerin de antimikrobiyal aktivitede kritik rol oynadıklarını ve diğer bileşenlerle sinerjik veya antagonistik etki oluşturmalarının mümkün olabileceği belirtilmektedir [8, 21, 61, 62, 63, 64, 152].

Bitki metaboliti olan uçucu yağların başta mikroorganizmaları inhibe edici veya onları öldürücü etkileri olmak üzere tedavi konusunda dikkati çeken birçok özelliklerinin olmasından dolayı, bu ürünlerden yararlanmanın bilimsel ve ekonomik açılardan yarar sağlayacağı düşüncesindeyiz. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar

test edilen tüm uçucu yağların test mikroorganizmaları üzerinde belirli ölçülerde etkili olduklarını göstermiştir. Dolayısıyla test edilen bu uçucu yağların daha ileri boyutlarda toksikolojik ve farmakolojik özelliklerinin araştırılmasından sonra tıp, kozmetik ve endüstriyel alanlarda kullanımlarının söz konusu olabileceğini kanımsındayız.

KAYNAKLAR

- [1] Vural, M., Karavelioğulları, F., Polat, H., “Çiçekdağı (Kırşehir) ve çevresinin etnobotanik özellikleri”, *The Herb Journal Of Systematic Botany*, **4**, 1, (1997), 117.
- [2] Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul (1999), 3.
- [3] Altan, Y., Uğurlu, E., Gücel., S., “Şenkaya (Erzurum) ve çevresinin etnobotanik özellikleri”, I. International Symposium on Protection of Natural Environment and Ehlami Karaçam, Kütahya (1999).
- [4] Öztürk, M. S., Ekonomik Botanik, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Erzurum, (1986), 40.
- [5] Acartürk, R., Şifalı bitkiler Flora ve Sağlığımız, Reprovizyon Ltd. Şti., Ankara (1997), 2.
- [6] Karamanoğlu, K., Farmasötik Botanik Ders Kitabı, Ankara üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basım Evi, Ankara (1977), 44.
- [7] Sayar, A., Güvensan, A., Özdemir, F., Öztürk, M., “Muğla (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri”, *The Herb Journal Of Systematic Botany*, **2**, 1, (1995), 151.
- [8] Burt, S., “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review”, *International Journal Of Food Microbiology*, **94**, (2004), 223.
- [9] WHO monographs on selected medicinal plants, World Health Organization, Geneva, **1**, (1999), 1.
- [10] Tümen, G., Satıl, F., Yıldırım, O., Trakya ve Batı Anadolu’da Yetişen Satreja Türlerinin Sistemik Revizyonu ve Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimlerinin Mukayesesi, 95/9, Balıkesir Araştırma Fonu İşletme Müdürlüğü, 155.

- [11] Dorman, H.J.D., Deans, S.G., “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, (2000), 308.
- [12] Çubukçu, B., Meriçli, A. H., Mat, A., Sarıyer, G., Sütülpınar, N.ve Meriçli, F., Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmokognozi Anabilim Dalı, İstanbul, (2002), 1.
- [13] Schicher, H., “The significance of phytotherapy in Europe”, *Zeitschrift für Phytotherapie*, **14**, (1993), 132.
- [14] Öztürk, Y., “İlaç ve tıbbi bitkiler yönünden Hindistan’a bakış”, *Pharmacia YJTPA*, **30**, 3, (1990), 145.
- [15] Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, R.M.R., Faidi Y.R., Salem, K., Al-Nuri, M.A., “Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area”, *Journal of Ethnopharmacology*, **60**, (1998), 265.
- [16] Palombo, E.A., Semple, S.J., “Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants”, *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, (2001), 151.
- [17] Skočbušić, M., Bezić, N., Dunkić, V., “Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis.growing in Croatia”, *Food Chemistry*, **96**, (2006), 20.
- [18] Rasooli, I., Mirmostafa, S.A., “Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *thymus serpyllum* essential oils”, *Fitoterapia*, **18**, (2002), 244.
- [19] Deans, S.G., Ritchie, G., “Antibacterial properties of plant essential oils”, *International Journal of Food Microbiology*, **5**, (1987), 165.
- [20] Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D., Riley, T.V., “Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **35**, (1995), 421.
- [21] Mourey, A., Canillac, N., “Anti-*Listeria Monocytogenes* activity of essential oils components of conifers”, *Food Control*, **13**, (2002), 289.
- [22] Bishop, C.D., “Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus”, *Journal of Essential Oil Research*, **7**, (1995)

- [23] Azzouz, M.A., Bullerman, L.B., “Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents”, *Journal of Food Protection*, **45** (14), (1982), 1298.
- [24] Akgül, A., Kıvanç, M., “Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi”, *International Journal of Food Microbiology*, **6**, (1988), 263.
- [25] Jayashree, T., Subramanyam, C., “Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation”, *Letters in Applied Microbiology*, **28**, (1999), 179.
- [26] Mari, M, Bertolini, P., Pratella, G.C., “Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases”, *Journal of Applied Microbiology*, **94**, (2003), 761.
- [27] Akgül, A., Kıvanç, M., Sert, S., “Effect of carvacrol on growth and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*”, *Sciences des Aliments*, **11**, (1991), 361.
- [28] Ultee, A., Smid, E.J., “Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Basillus cereus*”, *International Journal of Food Microbiology*, **64**, (2001), 373.
- [29] Juglal, S., Govinden, R., Odhav, B., “Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi”, *Journal of Food Protection*, **65** (4), (2002), 683.
- [30] Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S., “Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds”, *Journal of Phytopathology*, **148**, (2000), 501.
- [31] Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Luciano, J.H.S., “Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. And eugenol against *Haemonchus contortus*”, *Veterinary Parasitology*, **109**,1-2, (2002), 59.
- [32] Konstantopoulou, I., Vassilopoulou, L., Mavragani-Tsipidou, P., Scouras, Z.G., “Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*”, *Experientia*, **48**, 6, (1992), 616.

- [33] Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., "Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, (1998), 1111.
- [34] Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. And Haroutounian, S. A., "Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species", *Z.Naturforsch*, **57**, (2002) 287.
- [35] Guenther, E., *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York (1948).
- [36] Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim (2001)
- [37] Crosthwaite, D., "UK trade within the flavour and fragrance industry", International Federation of Essential Oils and Aroma Trades- 21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London (1998)
- [38] Carson, C.F., Riley, T.V., "Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*", *Letters in Applied Microbiology*, **16**, (1993), 49.
- [39] Boyle, W., "Spices and essential oils as preservatives", *The American Perfumer and Essential Oil Review*, **66**, (1955), 25.
- [40] Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*, CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam (1999), 4.
- [41] Bauer, K., Garbe, D., *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1985), 11.
- [42] Van Welie, R.T.H., *Alle cosmetica ingredienten en hun functies*. Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein (1997)
- [43] Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J., "S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound", *Industrial Crops and Products*, **4**, (1995), 23.
- [44] Manabe, A., Nakayama, S., Sakamoto, K., "Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalitoyl phosphatidylcholine-liposomes", *Japanese Journal of Pharmacology*, **44**, (1987), 77

- [45] Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., “The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)”, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, (2000), 170.
- [46] Van Krimpen, M.M., Binnendijk, G.P., “Ropadiar® as alternative for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs”, *Lelystad, Praktijkonderzoek Veehouderij*, (2001), 14
- [47] Ilsley, S., Miller, H., Greathead, H., Kamel, C., “Herbal sow diets boost pre-weaning growth”, *Pig Progress*, **18**, 4, (2002), 8.
- [48] Mendoza-Yepes, M. J., Sanchez-Hidalgo, L.E., Maertens, G., Marin-Iniesta, F., “Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese”, *Journal of Food Safety*, **17**, (1997), 47.
- [49] Cutter, C.N., “Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef”, *Journal of Food Protection*, **63**, 5, (2000), 601.
- [50] Hartmans, K.J., Diepenhorst, P., Bakker, W., Gorris, L.G.M., “The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases” *Industrial Crops and Product*, **4**, (1995), 3.
- [51] Salzer, U.J., “The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-a critical review” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **9**, 4, (1977), 345.
- [52] Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A., “Zur Analytik ätherische Öle: Zehn Jahre Ätherische-Öle-Forschung 1969 bis 1979” *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica*, **31**, 2, (1981), 39.
- [53] Wilkins, C., Madsen, J.O., “Oregano headspace constituents”, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **192**, (1991), 214.
- [54] Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., “GC/MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, (2000), 2576.

- [55] Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., “Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia”, *Journal of Essential Oil Research*, **12**, (2000), 516.
- [56] Jerkovic, I., Mastelic, J., Milos, M., “The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia” *International Journal of Food Science & Technology*, **36**, (2001), 649.
- [57] Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., “Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils”, *International Journal of Food Microbiology*, **74**, (2002), 101.
- [58] Senatore, F., “Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy)” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, (1996), 1327.
- [59] Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., “Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, (1998), 3741.
- [60] Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., “In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils”, *Letters in Applied Microbiology*, **29**, (1999), 130.
- [61] Marino, M., Bersani, C., Comi, G., “Impedance measurement to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae”, *International Journal of Food Microbiology*, **67**, (2001) 187.
- [62] Lattaoui, N., Tantaoui-Elaraki, A., “Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils”, *Rivista Italiana EPPOS*, **13**, (1994), 13.
- [63] Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven., B., “Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain”, *Journal of Food Protection*, **58**, 1, (1995), 81.

- [64] Marino, M., Bersani, C., Comi, G., “Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bio-impedometric method” *Journal of Food Protection*, **62**, 9, (1999), 1017.
1999
- [65] Arras, G., Grella, G.E., “Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity” *Journal of Horticultural Science*, **67**, 2, (1992), 197.
- [66] Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., “Effects of planting time and mineral fertilization on perpermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity” *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, (1994), 125.
- [67] McGimpsey, J.A., Douglas, M.H., Van Klink, J.L., Beauregard, D.A., Perry, N.B., “Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand”, *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, (1994), 347
- [68] Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., “Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*”, *Letter in Applied Microbiology*, **36**, (2002), 35.
- [69] Ultee, A., Bennink, M.H.J., Moezelaar, R., “The phenolic hydroxyl group of carvacrol is the essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*”, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(4), (2002), 1561.
- [70] Kokkini S., Karaousou R., Dardioti A., Krigas N., Lanaras T., “Autumun essential oils of Greek Oregano”, *phytochemistry*, **44**, (1997), 883.
- [71] Lis-Balchin, M., Ochoka, R.J., Deans, S.G., Asztemborska, M., Hart, S., “Differences in bioactivity between the enantiomers of a-pinene” *Journal of Essential Oil Research*, **11**, (1999), 393.
- [72] Ceylan, A., *Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler)*, **481**, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornava-İzmir, (1987), 1.
- [73] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk G., Bekat, L., Leblebici, E., *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, **116** Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, (2000), 276.

- [74] Zeybek, U., Zeybek, N., Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri, **3** (Değiştirilmiş 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, (2002), 378.
- [75] İrtem, H. S., Balıkesir Yöresinde Yetişen *Thymus* Türlerinin Uçucu Yağ İçerikleri ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2003)
- [76] Hedhili, L., Romdhane, M., Abderrabba, .A., Planche, H., Cherif, I., “Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link.”, *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, (2002), 26.
- [77] Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A., “Growth inhibition and morfological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*”, *Food Control*, **17**, (2006),3 59.
- [78] Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau, C., “Analysis of essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria”, *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, (2005), 235.
- [79] Başer, K.H.C., Demirci, B., Kirimer, N., Satıl, F., Tümen, G., “The essential oils of *Thymus migricus* and *T. fedtschenkoi* var. *handelii* from Turkey”, *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, (2002), 41.
- [80] Bağcı, E. ve Başer, K.H.C., “Study of essential oils of *Thymus haussknechtii* Velen and *Thymus kotschyanus* Boiss. et Holen var. *kotschyanus* (lamiaceae) taxa from the eastern Anatolian region in Turkey”, *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, (2005), 199.
- [81] Tümen, G., Kirimer, N. ve Başer, K.H.C., “Composition of the essential oils of *Thymus* species growing in Turkey”, *Chemistry of Natural Compounds*, **31**, (1995)
- [82] Başer, K.H.C., Tümen, G., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., “Halk ilacı olarak kullanılan *Thymus sibthorpii* Bentham”,9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, (16-19 Mayıs 1991), 389.
- [83] Işık, S., Gönüz, A., Arslan, Ü., Öztürk, M., “Afyon (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri”, *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, **2**, (1995), 161.

- [84] Stahl-Biskup E., Essential oil chemistry of the genus *Thymus* a global view, in Stahl-Biskup and Saez (eds) The genus *Thymus*, Taylor & Francis, London (2002) 75.
- [85] Stahl-Biskup E., Thyme as a herbal drug-pharmacopoeias and other product characteristics, in Stahl-Biskup and Saez (eds) The genus *Thymus*, , Taylor & Francis, London (2002) 293.
- [86] Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Portugal, H., “Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*”, *Phytotherapy Research*, **18**, (2004), 990.
- [87] Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., Sezik, e., “Composition of the Essential Oil of *Thymus eigii* (M. Zohary et P.H. Davis) Jalas from Turkey”, *J. Essent. Oil Res.*, **8**, (1996), 85.
- [88] Başer, K.H.C., Kirimer, N., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., “The Essential Oil *Thymus leucostomus* var. *argillaceus* ”, *J. Essent. Oil Res.*, **4**, (1992), 421.
- [89] Başer, K.H.C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., Yıldız., B., “Composition of Essential Oils of *Thymus leucostomus* Hausskn. et Velen var.*gypsaceus* Jalas and *Thymus pubescens* Boiss. et Kotschy ex Celak var. *cratericola* Jalas”, *J. Essent. Oil Res.*, **11**, (1999),776.
- [90] Tümen, G., Yıldız., B., Kirimer, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., “Composition of the Essential Oil of *Thymus fallax* Fisch. et Mey. from Turkey”, *J. Essent. Oil Res.*, **11**, (1999), 489.
- [91] Başer, K.H.C., Demirci, B., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., “Essential Oil of *Thymus zygoides* Griseb. var *zygoides* from Turkey”, *J. Essent. Oil Res.*, **11**, (1999), 409.
- [92] Başer, K.H.C., Kirimer, N., Ermin, N., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., “Essential Oils from Four Chemotypes of *Thymus zygoides* Griseb. var. *lycaonicus* (Celak) Ronniger”, *J. Essent. Oil Res.*, **8**, (1996), 615.
- [93] Baytop, T., Farmakognozi ders kitabı, 1, İstanbul Üniversitesi Yayını No:1810, Baha matbaası, (1972),155.
- [94] Özyurt, M.S., Ekonomik Botanik, Erciyes Üniversitesi Yayınları No: 47, Kayseri, (1992), 13.

- [95] Baytop, T., Farmakognozi, 1, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3399, Ecz. Fak., 51, İstanbul, (1986), 156
- [96] Tanker, M., Tanker, N., Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını No:65, Ankara, (1990), 269.
- [97] Baydar, H., Tıbbi, Aromatik ve Keyf bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, 51, SDÜ basımevi, (2005), 77.
- [98] Özatlı, N.S., Bitlis Yöresinde Yetişen Endemik *Thymus fedtschenkoi* Ronniger var. *handeli* (Ronniger) Jalas Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Korolojik Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, (1999)
- [99] Hiçsönmez, Ü., Eral, M., “Nükleer Teknolojide Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Yeri ve Uygulamaları” 8. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi 15-17 Ekim 2003 Kayseri
- [100] Erdik, E., Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Gazi Kitabevi, Ankara, 701.
- [101] Erdik, E., Obalı, M., Yüksekşık, N., Öktemer, A., Pekel, T. ve İhsanoğlu, E., Denel Organik Kimya, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No:145, 93.
- [102] Ustaçelebi, Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş kitapevi, Ankara, 1999, 103.
- [103] Virella, G., Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları, Serter, D., Nobel Tıp Kitapevleri, İzmir, (1997), 85.
- [104] Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Island, 7, Univ. Press, Edinburg, (1982), 349.
- [105] Yıldız B., Tümen G., Demirkuş, N., Adıgüzel, N., Akyalçın, H., Bahçecioğlu, Z., Türkiye’de yetişen *Thymus L.* (Lamiaceae) Türlerinin Revizyonu ve Türler Üzerinde Palinolojik ve Kimyasal Araştırmalar, TBAG-1715 (198T003), Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, (2004), 20.
- [106] Hasenekoğlu, İ., ve Yeşilyurt, S., Mikrobiyoloji, Erzurum (2002), 12.
- [107] Bilgehan, H., Klinik Mikrobiyoloji (Özet Bakteriyoloji), Barış Yayınları, İzmir, (2000), 25.

- [108] Midi, İ., Ekinçi, G., Yaroğlu, S., Aktan, S. “Listeria Monositogeneze Bağlı Beyin Absesi: Olgu Sunumu” *Fırat Tıp Dergisi*, **10**, 1, (2005), 36.
- [109] Faber, J. M. & Peterkin, P. I. “*Listeria monocytogenes*: A foodborne pathojen” *Microbiology Review*, **55**, (1991), 476.
- [110] Van-Renterghen, B., Hysmen, F., Rygole, R., & Verstraete, W. “Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the aricultural ecosystem” *Journal of Applied Bacteriology*, **71**, (1991), 211.
- [111] Ekici, K., İşleyici Ö., Sağun, E. “ Süt ve Süt Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığı” *YYU. Vet. Fak. Derg.*, **15**, 1-2, (2004), 97.
- [112] Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Gedikoğlu, S., Göral, G. Ve Helvacı, S., Klinik Mikrobiyoloji, Kılıçturgay, Bursa Güneş & Nobel Kitapevleri, Bursa, (1994).
- [113] Baykan, S., Özerol, H., Kart, H., Baysal, B. “Bir serratia sepsisi olgusu” *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **1**, 3, (1994), 210
- [114] Deguzman, C., “Serratia”, Soil microbiology Biol/CSES 4684 http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/Serratia.html (02-03-2006)
- [115] Odds, F. C., Van Nuffel, L., Dams, G., “Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection”, *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, (1998), 2896.
- [116] Hasenekoğlu, İ., Toprak Mikrofungusları, 1, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 689, Erzurum, (1991), 107.
- [117] Çakır,C., “*Alternaria* spp. Alternaria yaprak lekesi” <http://www.bitkisagligi.net/Crucifer/ozellik.asp?patlatin=Alternaria%20spp.> (12-05-2006)
- [118] Çakır,C., “*Aspergillus niger* Siyah küf hastalığı” http://www.bitkisagligi.net/Cilek_Aspgillus_niger.htm (11-05-2006)
- [119] Hasenekoğlu, İ., Toprak Mikrofungusları, 5, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 689, Erzurum, (1991), 1.
- [120] Çakır,C., “*Penicillium expansum* Mavi Küf” http://www.bitkisagligi.net/Elma/elma_hastaliklari.asp (11-05-2006)

[121] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test, 6th ed., Approved Standard, M2-A6. NCCLS, Wayne, PA., (1997).

[122] Köneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P.C. and Winn W. C., Colour Atlas and Testbook of Diagnostik Microbiology, Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, (1997), 785.

[123] Dharmaraj, N., “Ruthenium(II) complexes containing bidentate Schiff base and their antifungal activity”, *Transition Metal Chemistry*, **26**, (2001) 105.

[124] Başer, K.H.C., Kırımer, N., Tümen, G., Duman, H. “Composition of the Essential Oil of *Thymus canoviridis* Jalas”, *Journal of Essential Oil Research*, **10**, (1998) 199.

[125] Tümen, G., Koyuncu, M., Kırımer, N., Başer, K.H.C. “Composition of the Essential Oil of *Thymus cilicicus* Boiss.& Bal.”, *Journal of Essential Oil Research*, **6**, (1994) 97.

[126] Akgül, A., Özcan, M. “Essential oils of four Turkish wild-growing Labiatae herbs: *Salvia cryptantha* Montbr. Et Auch., *Satureja cuneifolia* Ten., *Thymbra spicata* L. and *Thymus cilicicus* Boiss. et Bal.”, *Journal Essential Oil Research*, **11**, 2, (1999) 209.

[127] Javidnia, K., Miri, R. And Sadeghpour, H. “Composition of the volatile oil of *Achillea wilhelmsii* C., Koch from Iran”, *Daru*, **12**, (2004) 63.

[128] Svoboda, K. P. and Hampson, J. B., Biyoactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities, Speciality chemical fort the 21st century intermediary products, cosmetics and perfumes, medicinal applications, (1999)
www.ienica.net/specchemseminar/svoboda.pdf. (15-06-2006).

[129] Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGrimpsy, J.A. & Smallfield, B.M. “Essential oil from Dalmation sage (*Salvia officinalis* L.), variations among individuals, plant parts, seasons and sites”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, (1999), 2048.

[130] Baudoux, D. “Antiviral and antimicrobial properties of essential oils”, <http://www.positivehealth.com/permit/Articles/Aromatherapy/aud55.htm> (15-06-2006).

- [131] Akgül, A., Kıvanç, M. “Sensitivity four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and citrus peel”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **47**, (1989) 129.
- [132] Zambonelli, A., Zechini D’Aulerio, A., Bianchi, A., Albasani, A. “Effect of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro”, *Journal of Phytopathology*, **144**, (1996) 491.
- [133] Tantaoui-Elaraki, A., Errifi, A., Benjilali, B. and Lattaoui, N. “Antimicrobial activity of four chemically different essential oils”, *Rivista Italiana EPPOS*, **6**, (1992) 13.
- [134] Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I. “Composition and antimicrobial activity of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae”, *Journal of Ethnopharmacology*, **39**, (1993) 167.
- [135] Nelson, R.R.S. “In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **40**, (1997) 305.
- [136] Azaz, A.D., İrtəm, H.A., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., “Composition and the *in vitro* Antimicrobial Activities of the Essential Oils of some *Thymus* Species”, *Z. Naturforsch*, **59**, (2004), 75.
- [137] Delespaul, Q., Billerbeck, V.G., Roques, C.G., Michel, G., “The Antifungal Activity of Essential Oil as Determined by Different Screening Methods”, *J. Essential Oil. Res.*, **12**, (2000), 256.
- [138] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., “A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol”, *Journal of Applied Microbiology*, **91**, (2001), 453.
- [139] Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., “The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese”, *Food Microbiology*, **18**, (2001), 463.
- [140] Xianfei, X., Xiaoqiang C., Shunying Z., Guolin Z., “Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China”, *Food Chemistr*, (Article in press).
- [141] Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Atti-Serafini, L.A.L., Echeverrigaray, S., “Antibacterial activity of essential oils of *Salvia*

officinalis L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil”, *Food Chemistry*, (Article in press).

[142] Deans, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W., Penzes, L.G., “Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice” *Flavour and Fragrance Journal*, **60**, (1995), 323.

[143] Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J., “Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus*”, *Journal of Food Protection*, **63**(5), (2000), 620.

[144] Mevy, J.P., Bessiere, J.M., Dherbomez, M., Millogo, J., Viano, J., “Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke”, *Food Chemistry*, (Article in press).

[145] Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., “Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils”, *Microbios*, **89**,(1997) 39.

[146] Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I.B., Harvala, C., “Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*”, *Planta Medica*, **67**, (2001) 81.

[147] Knobloch, L., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, H.M., Vogenschow, H., Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.-J.(Ed.) *Progress in Essential Oil Research*. Walter de Gruyter, USA (1985) 429.

[148] Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., “Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, (1995) 2839.

[149] Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., “Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents”, *Journal of applied Bacteriology*, **76**, (1994) 626.

[150] Harborne, J.B., Williams, C.A., “Antocyanins and other flavonoids”, *Natural Product Report*, **7**, (1995) 639.

[151] Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Tottè, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., “Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some

aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo”, *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, (2002) 213.

[152] Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., “Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham”, *International Journal of Food Microbiology*, **73**, (2002), 83.