



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Gazi Eğitim Fakültesi Dekanlığı

Sayı : E-78797627-903.99-632965  
Konu : Prof. Dr. Hikmet  
KATIRCIOĞLU

10.04.2023

**THERAPHYTO YİĞİT MERT ALTINTAŞ ŞİRKETİNE**

Fakültemiz Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU'nun, "Theraphyto Defence Ağız Bakım Spreyinin Analiz Raporu" ekte gönderilmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

**Prof. Dr. Mahmut SELVİ**  
Dekan

Ek:8 syf.

Belge Doğrulama Kodu :BSD7UE61S3

**Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.**

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>



Evrak Tarih ve Sayısı: 10.04.2023-E.632965

Evrak Tarih ve Sayısı: 06.04.2023-E.630954

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ,  
EĞİTİM FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA**

THERAPHYTO Yiğit Mert Altıntaş şirketi ile sözleşme gereği yapmış olduğum analiz raporu ekte sunulmuştur. Firmaya vermek üzere gerekli resmi üst yazı için gereğini saygılarımla arz ederim.

Ek: Theraphyto defence ağız bakım spreyinin analiz raporu



05.04.2023

Prof. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

Mat. ve Fen Bil. Eğt. Böl., Biyoloji Eğt. A.B.D.

**THERAPHYTO DEFENCE AĞIZ BAKIM SPREYİ**  
**ÜRÜNÜNE AİT ANALİZ RAPORU**

**Deneme İçeriği:** Theraphyto Defence Ağız Bakım Spreyinin antimikrobiyal etkinliğinin tespiti

**Uygulanan Metot Adı:** Disk diffüzyon testi, MIC testi, antibiyofilm, anti-QS.

***Antibakteriyel Aktivite Tayini:***

Ürünün antibakteriyel aktivitesini belirlemek amacıyla disk diffüzyon yöntemi kullanılmıştır (Kirby and Bauer 1996 ). ***Streptococcus mutans ATCC 25175, Staphylococcus aureus ATCC 29213, E.coli ATCC 25922 ve Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*** suşları Brain Heart Infusion (BHI) Broth ve Luria Bertani (LB) broth besiyerileri ekilerek 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kültürlerin her biri McFarland 0.5 bulanık değerine ayarlandı. Ardından kültürlerden 100'er µL alınarak BHI agar ve Mueller Hinton agar besiyerine yayma ekim yapıldı. Ekim yapılan her bir besiyerinin üzerine steril boş kağıt disk ve kontrol antibiyotiği eklendi. Kâğıt disklere 20 µL ürün emdirilerek besiyerleri 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından disklerin etrafından oluşan zonlar inhibisyon çapı (mm) olarak kaydedildi. Kontrol antibiyotiklerin (*S. aureus* ATCC 29213 için Rifampisin, *E.coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için Ciproflaxin) oluşturduğu zon çapı ile aşağıda verilen şekilde yapılan hesaplama ile antimikrobiyal indeks bilgisi de hesaplandı (Ghasemi ve ark 2003, Ayaz ve ark. 2021).

Antimikrobiyal İndeks : Test materyali inhibisyon zon çapı /Antibiyotik inhibisyon zon çapı× 100

***MIC (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) Tayini:***

Her ekstraktın seyreltme serileri 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15, 0.07, 0.03 ve 0.01 mg/mL olarak ayarlandı ve LB ortamı olarak 96 oyuklu mikrotiter plakalara aktarıldı. Plakalara 100 µL McFarland 0.5 ayarlanmış taze kültürler eklendi ve plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Test mikroorganizmalarına karşı MİK değeri, mikroorganizmaları ve besiyerini henüz içeren kontrol parametreleri ile değerlendirildi. ***Test mikroorganizmalarına karşı MIC değeri 0,31 mg/mL olarak tespit edildi.***

Quorum sensing (QS) mekanizması üzerinde yapılan çalışmalar seçilen bakteri üzerinde inhibisyon/öldürme etkisi olmayan dozlar üzerinden olmalıdır. Bilindiği üzere bu mekanizma mikroorganizma üremesinin belirli bir yoğunluğa gelmesi ile aktifleşmektedir. Aktif hale gelen QS mekanizması ise gen regülasyonunu etkilediği sistemleri aktif hale getirmektedir. Örneğin biyofilm oluşumu, sporulasyon, ışımaya, viyolasin pigmenti üretimi gibi.

### **Antimikrobiyal Aktivite Tayini:**

Biyofilm oluşumu üzerinde inhibe edici etkinin araştırılması amacıyla kristal viyole yöntemi kullanıldı. Bu amaçla *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ve *Candida albicans* ATCC 10231 mikroorganizmaları seçilmiştir. Seçilen mikroorganizmalardan *S. mutans* 25175 BHI besiyerinde ve *C.albicans* 10231 SDB (Sabouraud Dextrose Broth) besiyerinde 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Ardından her kültür McFarland 0.5 bulanıklık değerine ayarlandı. 24 kuyucuklu plaklarda her bir kuyucukta toplam hacim 1000µL olacak şekilde mikroorganizma, besiyeri ve ürün eklendi. Kontrol kuyucukları sadece mikroorganizma ve besiyeri olacak şekilde düzenlendi. Tüm plaklar 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla öncelikle kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından tüm kuyucuklar PBS (phosphate buffered saline) ile 3 kez yıkandı. Yıkanan kuyucuklar 65 °C derecede kurutuldu. Ardından %1'lik kristal viyole eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Boyama işleminin ardından boya uzaklaştırılan kuyucuklar PBS ile yıkandı. Tutunmuş hücrelerdeki boya %30 asetik asit çözeltisi ile çözdürülerek 595 nm'de spektrofotometrede okundu. Sonuçlar yüzde biyofilm inhibisyonu olarak aşağıda verilen formüle göre değerlendirildi. Her bir mikroorganizma için en az 3 tekrarlı olacak şekilde deneyler devam ettirilmiştir.

$(\text{Kontrol OD}_{595} - \text{Uygulama OD}_{595}) / \text{Kontrol OD}_{595} \times 100 = \text{Biyofilm İnhibisyon yüzdesi}$

### **Viyolasin Pigmenti İnhibisyonu**

Viyolasin pigmenti *C. violaceum* türünün ürettiği bir pigment olup QS mekanizması ile denetlenmektedir. Viyolasin pigmenti sentezinin inhibisyonunu tespit etmek üzere *C. violaceum* 026 suşu kullanılmıştır.

**SONUÇ:**

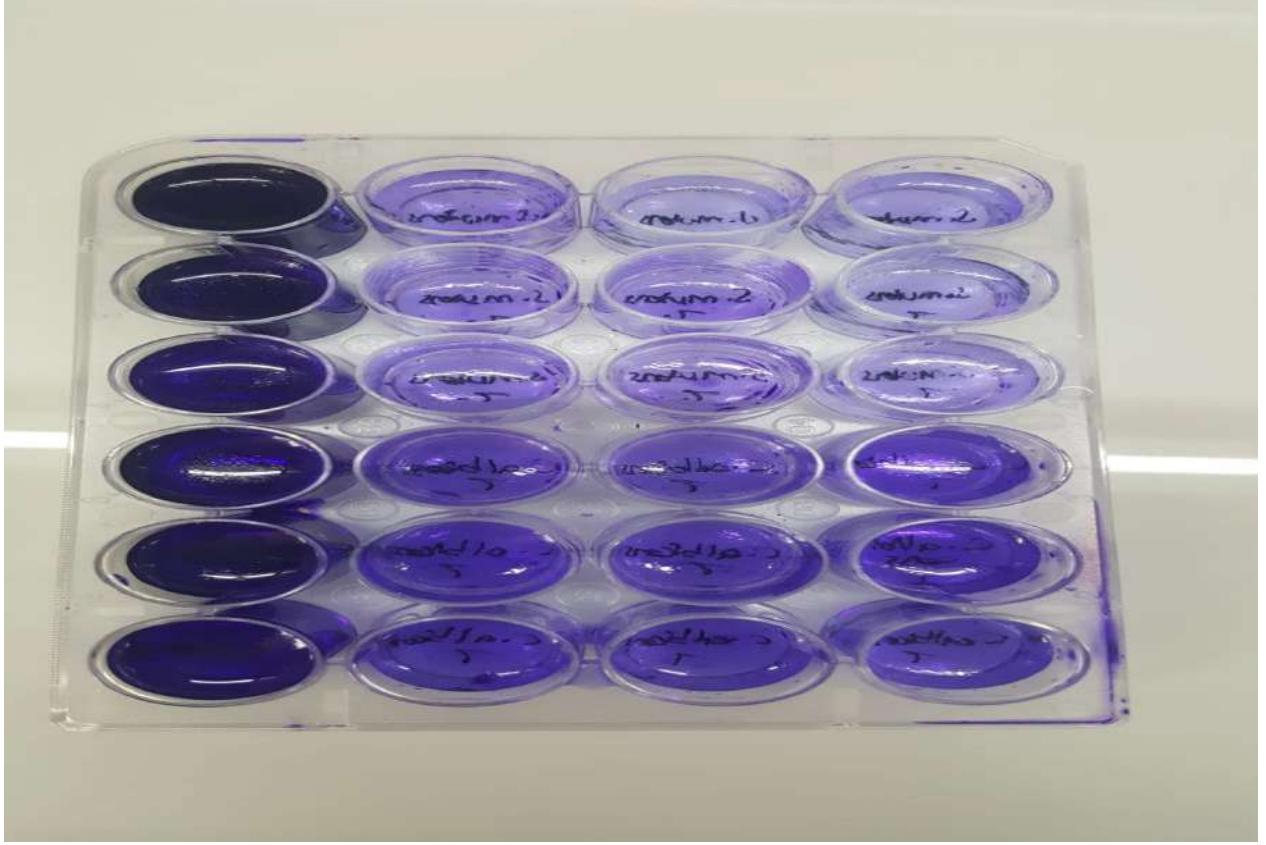
Elde edilen sonuçlar Tablo 1. de verilmiştir.

Tablo 1. Antibakteriyel aktivite sonuçları (mm)

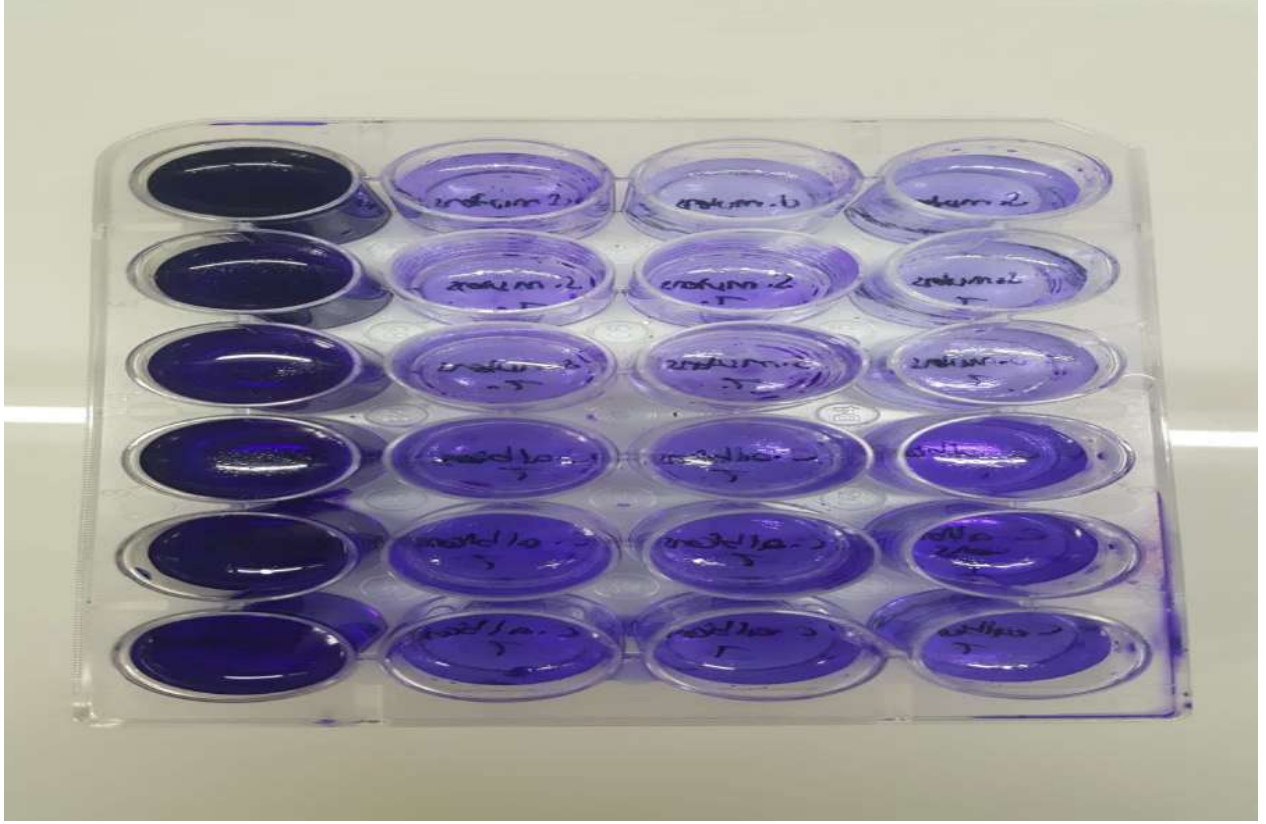
	Ürün inhibisyon zon çapı (mm)	Antibiyotik zon çapı (mm)	Antimikrobiyal indeks (%)
<b><i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</b>	<b>15±0,50*</b>	23±0.1	<b>55*</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	14±0,50	26±0.1	53
<i>E.coli</i> ATCC 25922	17±0,10	34±0,1	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15±0,10	33±0,1	45
<b><i>Candida albicans</i> ATCC 10231</b>	<b>45±0,5*</b>	22.60± 0.53	<b>290*</b>

Yapılan testler sonucuna göre özellikle ağız ve diş florası bakterilerinden *Streptococcus mutans* ATCC 25175 karşı ürünün antimikrobiyal indeksi %53 bulunmuş olup mevcut antibiyotiklere göre ürün oldukça yüksek etkili olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan antibiyofilm aktivite çalışmaları değerlendirildiğinde söz konusu ürünün *S. mutans* ATCC 25175 üzerinde %95 biyofilm inhibe edici etkinliği saptanmıştır. *C.albicans* ATCC 10231 üzerinde ise %90 biyofilm inhibe edici etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 1 ve 2’de yapılan çalışmalara ait antibiyofilm aktivite fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 1a. *S. mutans* ATCC 25175 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde antibiyofilm etkinliği (özellikle renk skalasında da gözle görülebilir farklılık dikkat çekicidir)



Şekil 1b. *S. mutans* ATCC 25175 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde antibiyofilm etkinliği (özellikle renk skalasında da gözle görülebilir farklılık dikkat çekicidir)



Disk diffüzyon yöntemi ile viyolosin pigment inhibisyonu elde edilen sonuçlara göre ürünün zon değeri ortalama  $63 \pm 0,57$  mm olarak tespit edilmiştir.

**Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında Theraphyto defence isimli ağız bakım sprey ürününün özellikle ağız ve diş sağlığı ile boğaz florası üzerinde oldukça yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.** Şu ana kadar yapılan çalışmalar içerisinde ağız içi florada 774 farklı bakteri türü tespit edilmiştir. Bakterilerin bu denli yüksek sayıda ve ağzın çeşitli bölgelerinde yaşamalarına imkân veren etkenler; diş minesinde plak oluşumu, oksijene karşı dayanıklılık, diş yüzeyine tutunma ve üreme, ağız içinde değişiklik gösteren pH değerleri ve karbonhidrat değerlerine karşı dirençtir. Bunlara ek olarak ağız boşluğundaki ılık ve nemli ortam, tükürük proteinleri, glikoproteinler ve diş eti sıvısı mikroorganizmaların beslenebileceği bir zemin hazırlamaktadır. Gerçekte, *Candida spp.*nın da endodontide sıklıkla kullanılan bazı dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Apikal periodontitisi olan doldurulmuş dişlerden en sık izole edilen mantar türünün ise *Candida albicans* olduğu bildirilmiştir (Sundqvist ve ark., 1998). Enfeksiyonların tekrarlanması farklı bakteri ve mayaların canlılığını korumasından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple literatürde yer alan çalışmalarda *S. mutans* gibi sidal ürünlere dirence sahip gram pozitif bakterisinin ek olarak *C. albicans* mantarın da test yapılmış ve ürünün önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

#### Referanslar

- 1) A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol. 45(4), 493–496 (1966)
- 2) Y. Ghasemi, M.T. Yazdi, S. Shokravi, N. Soltani, G. Zarrini, Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields Cyanobacteria from the north of Iran. J Sci Islam Repub Iran 14, 203–209 (2003)
- 3) Ayaz, F., Köngül Şafak, E., Erkan Türkmen, K., **KATIRCIOĞLU, H.** et al. Assessment of antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxic activities, and characterization of phenolic compounds of *Origanum haussknechtii*. Food Measure 15, 4267–4276 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00984-w>



5.04.2023

Prof. Dr. Hikmet Katircioğlu

(Endüstriyel Mikrobiyolog)

Gazi Üniversitesi, Biyoloji Eğt. A.B.D.