

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN ANTİBİYOFİLM
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**



Yağmur TUNCA PINARLI

Eylül, 2022

İZMİR

BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı

Yağmur TUNCA PINARLI

Eylül, 2022

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

YAĞMUR TUNCA PINARLI tarafından DOÇ. DR. KEREM CANLI yönetiminde hazırlanan “BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Kerem CANLI

Yönetici

Prof Dr. Çetin ILGAZ

Prof.Dr.Ergin Murat ALTUNER

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Okan FISTIKOĞLU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde engin bilgilerinden yararlandığım, tecrübesi ve desteğiyle hep yanımda olan ve akademik hayatıma yeni yollar açan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kerem CANLI'ya,

Tez çalışmalarımın sayısal sonuçlarının değerlendirilmesinde mesleki bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e,

Tez çalışmalarına ait bitki materyallerin temini konusunda yardımlarını esirgemeyen Dr. Mustafa Eray BOZYEL'e,

Tez döneminde bilimsel bilgileri, güler yüzleri ve dostluklarını esirgemeyen Uzm. Atakan BENEK VE Dilay TURU'ya,

Her anımda yanımda olan, desteğini esirgemeyen, sevgi ve sabrı ile yolumu aydınlatan hayat arkadaşım Serkan PINARLI'ya,

Sevgileri ile her gün içimi ısıtan kızım Nil PINARLI ve oğlum Yağız PINARLI'ya,

Hayatım boyunca her şartta desteklerini esirgemeyen, her koşulda sevgileriyle yanımda olan sevgili annem, sevgili babam ve kardeşim Selim TUNCA'ya içtenlikle teşekkürü bir borç bilirim.

Yağmur TUNCA PINARLI

BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

ÖZ

Biyofilm, bakterilerin birlikte yaşamaları sonucu ortaya çıkan ve Mikroorganizmalar ı olumsuz çevre koşullarından koruyan bir organizasyondur. İlk başlarda endüstriyel bir sorun gözüyle bakılan biyofilm oluşumunun yapılan araştırmalar sonucu sadece endüstri alanında değil birçok sağlık sorunu ile de ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotik tedavileri diğer bakteriyel enfeksiyonlara göre daha zordur. Özellikle tıbbi malzemelerdeki biyofilm oluşumu biyomateriyallerin fonksiyonuna etki etmekle birlikte ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bitkiler yüzyıllardır hem modern tıp hem de fitoterapi alanında doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Özellikle son zamanlarda kullanılan sentetik ilaçların tedavideki etkinliğinin azalması bilim insanlarını bitkilerin farmakolojik etkileri üzerinde araştırmalar yapmasına neden olmaktadır. Biyofilmlerin dezenfektanlara, antibiyotik ve sentetik ilaçlara direnci yüksek olduğundan bitkilerden elde edilen ekstraktlar bilim insanları tarafından antibiyofilm aktiviteleri üzerine çalışmalara başlamışlardır. Türkiye florasının on üç bine yakın bitki türünün üç bini endemik bitkilerden oluşmaktadır. Bu çalışmada *Achillea fraasii*, *Sideritis trojona* ve *Galanthus trojona* endemik bitkilerinden elde edilen ekstratların *Bacillus subtilis* DSMZ 1971, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* 1214816 suşlarının oluşturduğu biyofilme etkisi çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antibiyofilm, biyofilm, endemik bitki

DETERMINATION OF ANTIBIOFILM ACTIVITY OF SOME ENDEMIC PLANTS

ABSTRACT

Biofilm is an organization that emerges as a result of the coexistence of bacteria and protects microorganisms from adverse environmental conditions. Biofilm formation, which was initially regarded as an industrial problem, has emerged as a result of researches, not only in industry but also associated with many health problems. Antibiotic treatment of biofilm-forming bacteria is more difficult than other bacterial infections. In particular, biofilm formation in medical materials affects the function of biomaterials and causes serious infections. Plants have been used for centuries as a natural medicine in both modern medicine and phytotherapy. Especially, the decrease in the effectiveness of synthetic drugs used recently in the treatment causes scientists to conduct research on the pharmacological effects of plants. Since the resistance of biofilms to disinfectants, antibiotics and synthetic drugs is high, the extracts obtained from plants have started to work on antibiofilm activities by scientists. Three thousand of the thirteen thousand plant species of the flora of Türkiye are endemic plants. In this study, the effects of extracts obtained from *Achillea fraasii*, *Sideritis trojana* and *Galanthus trojana* endemic plants were studied on the biofilm formed by *Bacillus subtilis* DSMZ 1971, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* 1214816 strains.

Keywords: Antibiofilm, biofilm, endemic plant

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZ.....	iii
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xv

BÖLÜM BİR - GİRİŞ.....	1
1.1 Türkiye Florasındaki Bazı Endemik Bitkiler.....	3
1.1.1 <i>Achillea fraasii</i>	3
1.1.2 <i>Sideritis trojana</i>	5
1.1.3 <i>Galanthus trojanus</i>	7
1.2 Bakteriler.....	8
1.2.1 <i>Basillus subtilis</i>	8
1.2.2 <i>Escherichia coli</i>	9
1.2.3 <i>Listeria ssp</i>	9
1.2.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2.3.2 <i>Listeria innocua</i>	10
1.3 Biyofilm	10
1.3.1 Biyofilmin Tarihçesi.....	10
1.3.2 Biyofilmin Yapısı	12
1.3.3 Biyofilmin Oluşum Basamakları.....	14
1.3.3.1 Tutulma.....	15
1.3.3.2 Yapışma	15
1.3.3.3 Kolonizasyon	15
1.3.3.4 Olgunlaşma.....	16
1.3.3.5 Kopma ya da Ayrılma.....	16

1.3.4 Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	16
1.3.5 Biyofilm Oluşum Sebepleri.....	17
1.3.5.1 Savunma	17
1.3.5.2 Adezyon ve Kolonizasyon	17
1.3.5.3 Yaşanabilir Çevre Geliştirme	18
1.3.5.4 Kominite Oluşturma.....	18
1.3.6 Biyofilm Oluşturma Avantajları	18
BÖLÜM İKİ - YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
BÖLÜM ÜÇ - MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Test Tüpleri.....	22
3.1.2 Öze	22
3.1.3 Filtre Kâğıdı.....	22
3.1.4 Enjektör Filtresi	23
3.1.5 Enjektör.....	23
3.1.6 Steril Mikropipet Uçları	23
3.1.7 96 Kuyucuklu Mikroplakalar	23
3.1.8 Falcon Tüpler	23
3.1.9 Otomatik Mikropipetler	23
3.1.10 Cam Şişeler	24
3.1.11 Cam Erlenler.....	24
3.1.12 Distile Su	24
3.1.13 Serum Fizyolojik.....	24
3.1.14 Luria Bertani Broth.....	24
3.1.15 Kristal Viyole.....	24
3.1.16 Aseton.....	25
3.1.17 Glikoz Monohidrat.....	25
3.1.18 Parafilm.....	25
3.1.19 Etil Alkol	25
3.1.20 Maske.....	25
3.1.21 Muayene Eldiveni.....	25

3.2 Cihazlar.....	26
3.2.1 Biyogüvenlik Kabini	26
3.2.2 Otoklav.....	26
3.2.3 Etüv.....	26
3.2.4 Liyofilizatör.....	26
3.2.5 Mikroplaka Okuyucu.....	26
3.2.6 Orbital Çalkalayıcı.....	27
3.2.7 Hassas Terazî.....	27
3.2.8 Densitometre Cihazı.....	27
3.2.9 Elektronik Bek.....	27
3.3 Bitki Materyalleri	27
3.4 Kullanılan Mikroorganizmalar	28
3.5 Endemik Bitkilerinden Etken Madde Ekstraksiyonun Hazırlanması	29
3.6 Mikroorganizmalar ın Standardizasyonu.....	34
3.7 Besiyerlerinin Hazırlanması Ve İnokülasyonu.....	34
3.8 Etil Alkol – Aseton Karışımı Hazırlama.....	35
3.9 Kristal Viyole Boyası Hazırlanması.....	35
3.10. Biyofilm Oluşum Şartlarının Belirlenmesi	35
3.11 Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi.....	49
BÖLÜM DÖRT - BULGULAR	59
4.1 <i>Sideritis trojana</i> Bitkisinin Antibiyofilm Sonuçları.....	59
4.2 <i>Galanthus trojanus</i> Bitkisinin Antibiyofilm Sonuçları.....	61
4.3 <i>Achillea fraasii</i> Bitkisinin Antibiyofilm Sonuçları.....	64
BÖLÜM BEŞ - TARTIŞMA.....	67
BÖLÜM ALTI - SONUÇLAR.....	69
KAYNAKLAR	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	<i>Achillea fraasii</i> türünün ülkemizdeki yayılış alanları ,,,,,,,,,,çç,,,,,,,,.....	4
Şekil 1.2	<i>Achillea fraasii</i> türünün genel (A) ve çiçek (B) yapısının fotoğrafı	4
Şekil 1.3	<i>Sideritis trojana</i> Bornm genel görünüşü	6
Şekil 1.4	<i>Sideritis trojana</i> Bornm Türkiye’de dağılışı.....	6
Şekil 1.5	<i>Galanthus trojanus</i> genel görünüşü	7
Şekil 1.6	<i>Galanthus trojanus</i> Türkiye’de dağılışı	8
Şekil 1.7	Biyofilmlerin yapısal elementlerini oluşturan kule veya mantar benzeri kümelenmeyi gösteren mikro kolonilerin şematik görünümü	13
Şekil 1.8	Biyofilm oluşumu 5 aşamada gerçekleşmektedir. 1. Tutunma, 2. Yapışma, 3. Olgunlaşma, 4. Kolonizasyon, 5. Kopma aşamalarını göstermektedir. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mikrografi eşleştirilerek verilmiştir	14
Şekil 3.1	<i>Achillea fraasii</i> örneğinin kurutulmuş görünüşü ve robottan çekilmiş hali.....	30
Şekil 3.2	<i>Sideritis trojana</i> örneğinin kurutulmuş görünüşü ve robottan çekilmiş görüntüsü.....	30
Şekil 3.3	<i>Galanthus trojanus</i> örneğinin kurutulmuş görünüşü ve robottan çekilmiş hali.....	31
Şekil 3.4	Çalışılacak örneklerin distile su eklenmiş görüntüsü	32
Şekil 3.5	Orbital çalkalayıcıya yerleştirilmiş bitki ekstraktları çalkalama süreci.....	32
Şekil 3.6	Endemik bitki örneklerinin süzülme işlemi	33
Şekil 3.7	Liyofilizatörden suyun uzaklaştırılması	33
Şekil 3.8	Biyofilm oluşumunu saptamak için örnek mikropalak yüklenmesi	37
Şekil 3.9	Yıkama işlemi yapılan mikropalaka	37
Şekil 3.10	Kristal viyole yüklenmiş mikropalakalar.....	38
Şekil 3.11	Aseton – Etanol karışımının mikropalakaya aktarımı	38
Şekil 3.12	Bitki ekstraktlarının seyreltme işlemi yapılarak mikropalakalara yüklenme.....	50

Şekil 4.1	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	59
Şekil 4.2	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	60
Şekil 4.3	<i>Sideritis trojana</i> bitkisini <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	60
Şekil 4.4	<i>Sideritis trojana</i> bitkisini <i>Listeria innocua</i> suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	60
Şekil 4.5	<i>Sideritis trojana</i> bitkisini <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	61
Şekil 4.6	<i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	62
Şekil 4.7	<i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Listeria innocua</i> suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	62
Şekil 4.8	<i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Listeria monocytogenes</i> suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	62
Şekil 4.9	<i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	63
Şekil 4.10	<i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	63
Şekil 4.11	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği	64
Şekil 4.12	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Listeria monocytogenes</i> suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	64
Şekil 4.13	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Listeria innocua</i> suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	65
Şekil 4.14	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	65
Şekil 4.15	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği.....	65

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan endemik bitki bilgileri.....	28
Tablo 3.2 Tez çalışmasında kullanılan Mikroorganizmalar ın özellikleri.....	28
Tablo 3.3. Bitki ekstraktlarının madde miktarı	34
Tablo 3.4 LB Borth besiyerinde bulunan glikoz konsantrasyonu.....	35
Tablo 3.5 Mikroorganizmalar ın biyofilm saptama için yüklemesi	36
Tablo 3.6 <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşunun 24 saatlik mikropilaka okuyucunun ölçümleri.....	39
Tablo 3.7 <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşunun 48 saatlik mikropilaka okuyucunun ölçümleri.....	40
Tablo 3.8 <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşunun 24 saatlik istatistiksel verileri.....	40
Tablo 3.9 <i>Escherichia coli</i> 1214329 suşunun 48 saatlik istatistiksel verileri.....	41
Tablo 3.10 <i>Listeria innocua</i> suşunun 24 saatlik mikropilaka okuyucusunun ölçümleri.....	41
Tablo 3.11 <i>Listeria innocua</i> suşunun 48 saatlik mikropilaka okuyucusunun ölçümleri.....	42
Tablo 3.12 <i>Listeria innocua</i> suşunun 24 saatlik mikropilakanın istatistiksel verileri.....	42
Tablo 3.13 <i>Listeria innocua</i> suşunun 48 saatlik mikropilakanın istatistiksel verileri.....	43
Tablo 3.14 <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşunun 24 saatlik mikropilaka okuyucunun ölçümleri.....	43
Tablo 3.15 <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşunun 48 saatlik mikropilaka okuyucunun ölçümleri	44
Tablo 3.16 <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşunun 24 saatlik mikropilakanın istatistiksel verileri	44
Tablo 3.17 <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 suşunun 48 saatlik mikropilakanın istatistiksel verileri	45
Tablo 3.18 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşunun 24 saatlik mikropilaka okuyucunun ölçümleri	45

Tablo 3.19 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşunun 48 saatlik mikrolaka okuyucusunun ölçümleri.....	46
Tablo 3.20 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşunun 24 saatlik mikrolakanın istatistiksel verileri.....	46
Tablo 3.21 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşunun 48 saatlik mikrolakanın istatistiksel verileri.....	47
Tablo 3.22 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun 24 saatlik mikrolaka okuyucusunun ölçümleri.....	47
Tablo 3.23 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun 48 saatlik mikrolaka okuyucusunun ölçümleri.....	48
Tablo 3.24 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun 24 saatlik mikrolakanın istatistiksel verileri.....	48
Tablo 3.25 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun 48 saatlik mikrolakanın istatistiksel verileri.....	49
Tablo 3.26 <i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 259212 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	51
Tablo 3.27 <i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Listeria innocua</i> bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	51
Tablo 3.28 <i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonuç.....	52
Tablo 3.29 <i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonuç.....	52
Tablo 3.30 <i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> 1214816 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu reader sonuç.....	53
Tablo 3.31 <i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	53
Tablo 3.32 <i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	54
Tablo 3.33 <i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Listeria innocua</i> bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	54
Tablo 3.34 <i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	55

Tablo 3.35	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> 1214816 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	55
Tablo 3.36	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu	56
Tablo 3.37	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	56
Tablo 3.38	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	57
Tablo 3.39	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Listeria innocua</i> bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	57
Tablo 3.40	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin <i>Escherichia coli</i> 1214816 bakterisinin antibiyofilm mikrolaka okuyucu sonucu.....	58
Tablo 4.1	<i>Sideritis trojana</i> bitkisinin antibiyofilm Pearson korelasyon katsayıları.....	61
Tablo 4.2	<i>Galanthus trojanus</i> bitkisinin antibiyofilm Pearson korelasyon katsayıları.....	63
Tablo 4.3	<i>Achillea fraasii</i> bitkisinin antibiyofilm Pearson korelasyon katsayıları.....	66

SEMBOLER LİSTESİ

% : Yüzde

mL : Mililitre

μ L : Mikrolitre

nm : Nanometre

$^{\circ}$ C : Santigrat derece

atm: atmosfer (birim)



KISALTMALAR

ATCC : Amerikan tip kültür koleksiyonu

DSMZ : Alman mikroorganizma ve hücre kültürleri koleksiyonu

EPS : Ekzopolimer

LB Broth : Luria-Bertani Broth

QS : Quorum sensing



BÖLÜM BİR

GİRİŞ

Biyofilm, bakterinin ürettiği su bazlı polimerik matriks yapısının canlı veya cansız yüzeye yapışmasıyla oluşan hücre toplulukları olarak tanımlanmaktadır. Biyofilmi oluşturan bakteriler, kendileri tarafından üretilen ekzopolisakkarik matriks içine gömülü ve hareketsiz halde bulunurlar. Su ile temas eden bütün yüzey alanlarında biyofilm oluşumuna rastlanmaktadır. Evsel su borularında, endüstride kullanılan borularda, tıbbi cihazlarda ve biyomedikal malzemelerde biyofilm oluşumuna rastlanmaktadır. Biyofilm bakterilere antimikrobiyal direnç ve yaşamsal avantaj sağlamaktadır. Yüzey alanlarında oluşan biyofilmler ise bakterileri besin kıtlığı, kuraklık, dezenfektan, ph değişimleri gibi faktörlerden korumaktadır (Whitchurch vd., 2002).

İlk başta endüstriyel bir sorun olarak görülen biyofilm yapısının, yapılan araştırmalar sonucunda tedavisi zor enfeksiyonlara neden olduğu görülmüştür. Kronik doku hasarlarına neden olan birçok bakteriyel enfeksiyonun en önemli faktörlerinden biri olarak görülmektedir. Biyofilm oluşturan bu yapıyı Mikroorganizmalar diğer Mikroorganizmalar a göre birçok alanda avantaj sağlamaktadır. Antibiyotiklere direnç ve bulundukları konağın bağışıklık sisteminden kaçış biyofilmin mikroorganizmaya sağladığı avantajlara örnektir (Güven, 2015).

Tarih öncesinden başlayarak günümüze kadar bütün medeniyetler tarafından bitkiler şifa kaynağı olarak görülmüş ve tedavi amacıyla kullanılmıştır. Örneğin Osmanlı zamanında bulunan mesir macunu birçok bitkinin karışması ile meydana gelmiş ve hekimler tarafından şifa kaynağı olarak kullanılmıştır (Canlı, Yetgin, Akata ve Altuner, 2016).

Yeryüzünde 10.000.000'a yakın bitki türü mevcuttur. Dünya Sağlık Örgütünün çalışmalarına göre 20.000'e yakın bitki türünün fitoterapi amacıyla kullanıldığı tespit edilmiştir. Geçmişten gelen kültürel yaşamın bir sonucu olarak günümüzde insanoğlu hastalıklarının tedavisi için ilk başta bitkisel droglara başvurmaktadır. Ülkemizde yaklaşık olarak 500 türün tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Bozyel ve

Merdamert-Bozyel, 2020). Günümüzde reçetelerimizde yer alan aspirin, rezerpin, kinin gibi ilaçlar bitkisel kökenli etki maddelerine sahiptirler (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Arkeolojik çalışmalarda insanoğlunun bitkileri çeşitli alanlarda farklı amaçlar için yaşamlarında farklı materyaller halinde kullanıldığı görülmektedir. Parfüm, baharat, sabun ve ilaç bu alanlardan sadece birkaçıdır. Anadolu topraklarında bitki droglarının kullanımının çok eski dönemlere dayandığı bilinmektedir. Anadoluda hüküm sürmüş Hitit medeniyetine ait ilaç tabletlerindeki bitki isimleri kanıt olarak sunulmaktadır. Dünyaca ünlü Türk bilim insanı İbni Sina'ya ait olan El-Kanun fi't-Tıb adlı eserde bitkisel kaynaklı ilaçların yer aldığı görülmektedir. 60 yıl öncesine ait olan Irak Şanidar Mağarasında bulunan mezarın arkeolojik çalışmalarında peygamber çiçeği, gül hatmi, mor sümbül ve kanarya bitki türlerinin kalıntılarının bulunması insanoğlunun ölümden sonraki hayatlarında da bitkileri şifa kaynağı olarak görmelerinin bir kanıtıdır (Tozyılmaz, 2019).

Günümüzde ise sentetik ilaçların yan etkilerinin artması bilim insanlarının bitkisel kökenli ilaçlara yönelmesine ve araştırmasına neden olduğu görülmektedir. Tıbbi öneme sahip birçok bitki tedavi amacıyla ilk etapta kullanılmaktadır. Örneğin üst solunumun enfeksiyonunda ebe gümesi (*Malva vulgaris*), ateş düşürücü olarak sumak (*Rhus coriaria*), eklem ve bel ağrısında mercanköşk (*Origanum majorana*) gibi bitkilerden elde edilen droglar tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Top, 2018).

Bitkisel drogların hastalıkların tedavisinde kullanılması ve geleneksel tıp alanında bitki ekstraktları ile ilgili bilgi birikiminin eski dönemlere dayanması, bitkisel antibiyofil ajanlarının araştırılmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca son zamanlarda bakteriyel enfeksiyonların antibiyotiklere direncinin artması ve araştırmalar sonucu sentetik ilaçların yan etkilerinin tespiti bilim dünyasının yeni araştırmalar yapmasına neden olmaktadır. Yapılan literatür taraması bunu doğrulamaktadır. Gıda kökenli bir patojen olan *Yersinia enterocolitica* gram negatif bakterisine *Juniperus communis* (Adi Ardıç), *Juniperus phoenicea* (Finike Ardıcı) ve *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus* (Katran Ardıcı) bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibiyofil etkisi

gösterdiği tespit edilmiştir. *Staphylococcus sciuri* gram pozitif bakterisinin *Pinus nigra* (Kara Çam) bitkisinden elde edilen uçucu yağına, maksimum düzeyde antibiyotik etkisi görülmüştür (Turgut, 2016).

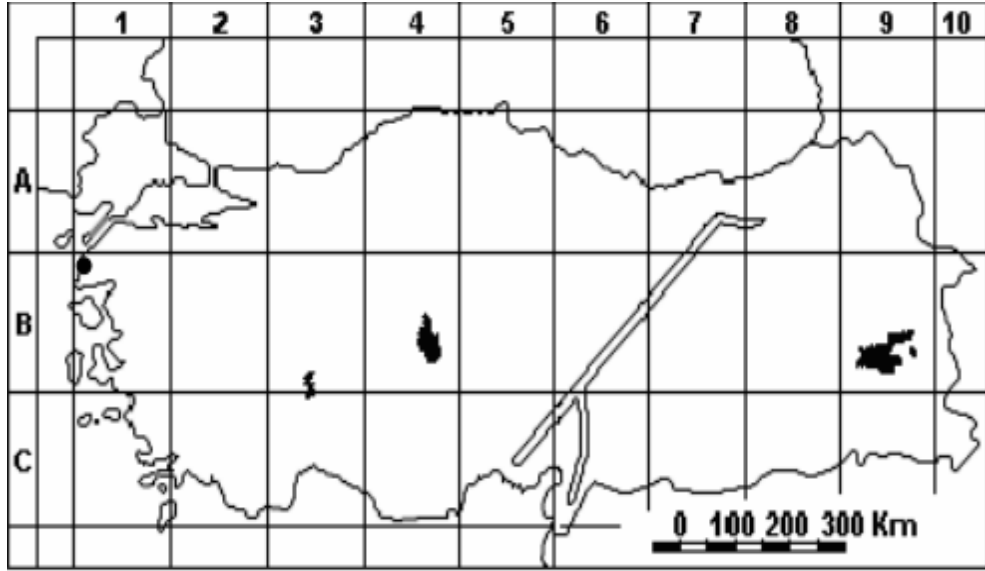
Morchella angusticeps (Köşeligöbek Mantarı), *Ganoderma lucidum* (Reişi Mantarı), *Ceriporus squamosus* (Pullu Mantar), *Trametes versicolor* (Hindi kuyruğu Mantarı) ve *Lentinula edodes* (Şitaki Mantarı) ile yapılan biyofilm çalışmasında *Enterococcus* türlerinin biyofilmine etki ettiği tespit edilmiştir (Karaca, Cihan, Akata ve Altuner, 2020).

Camelina sativa (Ketençik) bitkisinin *Salmonella infantis* bakterisinin biyofilmine yüksek düzeyde etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ülgen, 2019). Farklı ardıc türlerinden elde edilen ekstraktların nozokomial enfeksiyonların sebeplerinden biri olan *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin biyofilmine inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür (Önem, 2016).

1.1 Türkiye Florasındaki Bazı Endemik Bitkiler

1.1.1 *Achillea fraasii* Sch. Bip.

Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Alt sınıf	Magnoliidae
Sınıf	Eudicotidae
Takım	Asterales
Aile	Asteraceae
Cins	Achillea
Tür	<i>Achillea fraasii</i> (Çivan Perçemi)



Şekil 1.1 *Achillea fraasii* türünün ülkemizdeki yayılış alanları (Arabacı, 2006)



Şekil 1.2 *Achillea fraasii* türünün genel (A) ve çiçek (B) yapısının fotoğrafı (Arabacı, 2006)

Achillea fraasii (Çivan Perçemi) türü *Astereacea* familyasına ait ülkemizde Kazdağlarında yayılış gösteren endemik bir türdür. Türkiye’de yayılış alanı Çanakkale ve Kazdağları çevresidir (Şekil 1.1). Çiçek demetinin uzun olmasının yanında yapraklarının yatık, sık, ipeksi ve yünlü yapıda olması en belirgin özelliklerindendir. Bitkinin gövde yapısı 10-15 cm boylarında ipeksi ve yünsü özelliğe sahip, silindirik

ve rizomlu yapıdadır(Şekil 1.2). Çiçeklenme zamanı haziran ve temmuz aylarında gerçekleşirken bitki, 1500 metrede kalkerli toprak yapısında yetişmektedir. Gaz sancısı, mide sorunları, kabızlık, kalp rahatsızlığı ve antioksidan etkisi olduğu bilinmektedir (Yağan, 2018).

1.1.2 *Sideritis trojana* Bornm.

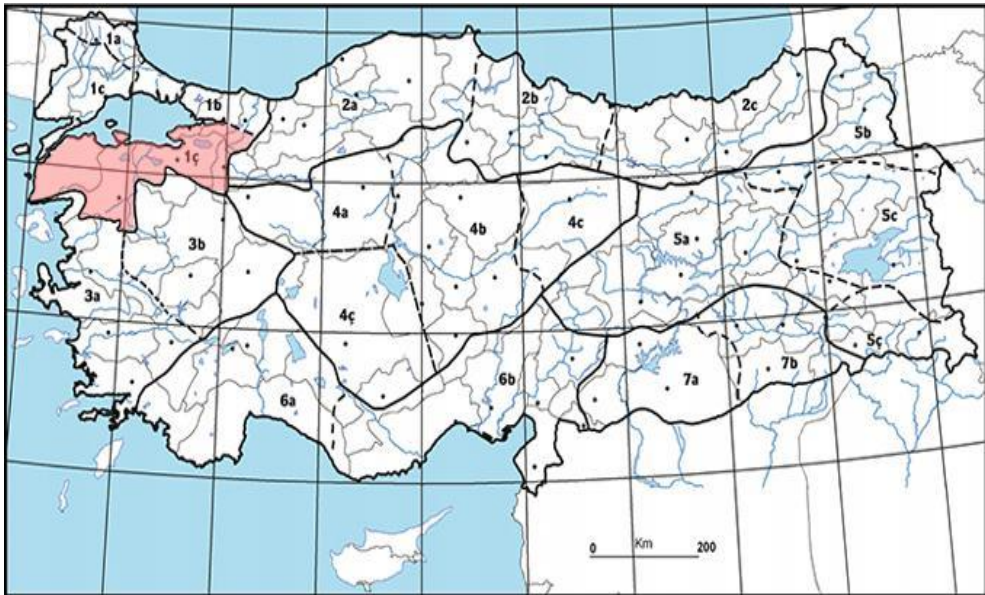
Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Magnoliidae
Takım	Lamiales
Aile	Lamiaceae
Cins	Sideritis
Tür	<i>Sideritis trojana</i> Bornm. (Sarıköz Çayı)

Lamiaceae familyasına ait olan *Sideritis trojana* türü halk arasında sarıköz çayı olarak bilinen endemik bir türdür. Otsu, çok yıllık ve çalı formda olan *Sideritis trojana*'yı diğer türlerden ayıran en belirgin özelliği koyu sarı çiçek yapısı ve yapraklarında beyaz yünsü tüylerin mevcut olmasıdır. Kazdağlarında yayılış gösterir (Şekil 1.4). Gövde yapısı beyaz ve yünlü tüyümsü yapıdadır. Yaprakların iki yüzeyinde bol miktarda salgı tüyleri ve amaryllis tipi stomalar mevcuttur. Ayrıca yaprak yapısını kısa saplı veya sapsız şekilde görebiliriz(Şekil 1.3) . Potasyum açısından fakir ve alkali olan topraklarda yetişmektedir. Çiçek yapısı gövde ekseninde 3-9 adet çiçekten meydana gelen çiçek kümesi halindedir. Bitki besin değeri açısından fakirdir (Uysal ve Öztürk, 1991).

Gövdesi 20-60 cm kadar ve dallarıyla beraber dört köşeli bir yapıya sahiptir. Temmuz ve Ağustos aylarında çiçeklenme görülür. Habitat alanı 1500-1730 m kayalık yamaçlardır. Halk arasında bitki çayı olarak kullanılmaktadır. Tıbbi açıdan sinir sistemin ve sindirim sistemine etki ettiği bilinmektedir (Atalay, 2014).



Şekil 1.3 *Sideritis trojana* Bornm genel görünüşü (Atalay, 2014)



Şekil 1.4 *Sideritis trojana* Bornm Türkiye’de dağılışı (URL-1)

1.1.3 *Galanthus trojanus* A.P. Davis & N. Özhatay

Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Magnoliidae
Takım	Aspargeles
Aile	Amaryllidoideae
Cins	Galanthus
Tür	<i>Galanthus trojanus</i> (Truva Kardeleni)



Şekil 1.5 *Galanthus trojanus* genel görünüşü (Karabacak, Esen ve Gürbüz, 2019)



Şekil 1.6 *Galanthus trojanus* Türkiye’de dağılışı (Karabacak, Esen ve Gürbüz, 2019)

Çanakkale, Bursa ve Balıkesir illerinin sınırları içinde yayılış gösteren endemik bir türdür. 1-1,6 cm çapında etrafı kuru, koyu kahve renkli soğan yapısı mevcuttur. Yapraklar karşılıklı ya da dış yaprak iç yaprağı sarmaktadır. Alt yaprak yüzeyi mumsudur. Üst yaprak kısmında belirgin damar mevcuttur. Yaprak kenar kısımları düz ya da bazen kıvrık yapıda olabilmektedir. Çimlenme zamanı Mart ayıdır. Genellikle 400-600 m eğimli kayalık arazilerde yayılış göstermektedir (Yüzbaşıoğlu, 2010).

1.2 Bakteriler

1.2.1 *Bacillus subtilis* DSMZ 1971

Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus subtilis* gram pozitif bir bakteridir. Çubuk şekline sahiptir. Aerobik Mikroorganizmalar dır ancak nitrat varlığında anaerobik olarak yaşam ve üremelerine devam edebilmektedirler. En belirgin özelliği oksijenli ortamda her bir organizmanın endospor oluşturabilmesidir. *Bacillus subtilis* ekosistemde spor halinde bulunmaktadır. Büyüme aşamasında çeşitli enzimler üretmektedir. Ürettiği bu enzimlerle ortamdaki diğer bakterileri engelleyerek çevreye ve besin maddelerine hâkim olur (Yonsel, 2010).

Bacillus subtilis 'in son yıllarda ürettiği enzimler deterjan, ilaç ve gıda alanlarında kullanılmaktadır. Gıda sanayinde, gıdaların bozulmasına neden olan Mikroorganizmaların üremelerini engelleyen veya ölmelerine neden olan enzimler, moleküller üretirler. Bu sayede gıda katkı maddelerinin üretilmesinde yararlanılmaktadır. İnsanlarda normal şartlarda patojen değildir, lakin bağışıklık sistemi düştüğünde patojen hale dönüşebilirler (Güneş, 2015).

1.2.2 *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesine ait gram negatif bir bakteri türüdür. Hücreleri çubuk şeklindedir. Yaşamlarına ve gelişimlerine hem oksijenli hem oksijensiz ortamda devam edebilirler. Kısacası fakültatif anaerob bakterilerdir. 37°C , üremeleri ve gelişimleri için uygundur. İnsan bağırsak florasında patojen özelliği olmayan kommensalizm yaşam süren suşları mevcut olduğu gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olan patojen suşları da vardır (Duarte vd., 2007).

Escherichia coli 'nin insan vücuduna gıda veya kirli sularla alınması sonucu ishal, zehirlenme, enterotoksijenik etki, beyin hasarı gibi etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. Gıda sanayisinde *Escherichia coli* 'nin doğrudan ya da dolaylı yoldan bulunması durumunda gıdanın hijyen kalitesinde eksik olduğu ortaya çıkmaktadır (Bektaş, 2014).

1.2.3 *Listeria ssp.*

Listeriaceae ailesine ait olan gram pozitif bakterilerdir. Spor oluşturma ve hareket yeteneği olmayan, çomak şeklinde olan Mikroorganizmalar dır. Aerob veya fakültatif anaerob özellik göstermektedirler. *Listeria* türlerinin çoğu hem insanda hem hayvanlarda patojen özellik göstermektedir. Sıcaklık değişimlerine göre hareketli ve hareketsiz forma geçebilirler. Karbon kaynağı olarak glikoz kullanmaktadırlar. Koloni oluşturma yetenekleri mevcuttur. *Listeria spp.* doğada toprak ve su gibi ortamlarda bulunurken gıdalarda ve gıda sanayisinde de mevcuttur (Cotter, Gaban ve Hill, 2000).

1.2.3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes yüksek tuzlu ortamlarda yaşayabilen, fakültatif anaerobik ve karbonhidratlardan asit oluşturabilen bir mikroorganizmadır. 1-45°C aralığında gelişme göstermekle beraber optimum gelişme sıcaklığı 37°C'dır. *Listeria* cinsleri arasında insanda patojen etki gösteren tek türdür. *Listeria monocytogenes* pH 4 olan ortamlarda bile yaşamlarını sürdürebilmeleri insan midesinden zarar görmediğini göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı virülansı açısından önem taşımaktadır (Cotter, Gaban ve Hill, 2000).

Listeria monocytogenes et, sebze, süt, hayvan ve insan dışkıları gibi birçok alanda yayılış göstermektedir. Yapılan araştırmalara göre hazır yiyeceklerde peynir, ızgara et, işlem görmüş et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* teşhis edilmiştir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

1.2.3.2 *Listeria innocua*

Listeria innocua çubuk şeklinde gram pozitif bir bakteridir. *Listeria innocua*, türünün *Listeria monocytogenes* 'e göre memelilerde hastalık oluşturma olasılığının düşük olduğu tespit edilmiştir (Atalan, 2019).

1-45°C aralığında yaşamlarını sürdürebildikleri için bu mikroorganizmaların buzdolaplarında gelişim olanağı sağladığı tespit edilmiştir. Bu durum gıdalardaki *Listeria* artışına ve doğal olarak listeriyozun görülme sıklığını arttırdığı tespit edilmiştir (Karaca, 2010).

1.3 Biyofilm

1.3.1 *Biyofilmin Tarihçesi*

1976 yılında Marshall bakterilerin değişik yüzeylere yapışmasını sağlayan çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerden bahsetmiştir. Daha sonra 1978 yılına kadar

biyofilmin varlığından söz edilmemiştir. Ancak 1978 yılında Costerton ve arkadaşlarının ortaya attığı teoriye kadar, biyofilmin önemi gerçek anlamda anlaşılmamıştır. Costerton ve arkadaşları biyofilmin Mikroorganizmalar a fayda sağlayan, canlı ve cansız yüzeylere tutunarak hayatta kalmalarını kolaylaştıran bir mekanizma olduğu fikrini savunmuşlardır. (Altınok, 2018).

Costerton ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada biyofilmin bakteriler tarafından oluşturulan polisakkarit yapıda glikokaliks bir sıvının içinde gömülü olarak bulunduğu ve söz konusu sıvının anyonik sulu bir teşkil ettiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada ekzopolisakkarit yapıdaki bu sıvının bakterilere adezyon yeteneğini sağladığı belirtilirken bakterilerin mikrokoloniler halinde bulunduğu tespit edilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002).

Bilimsel araştırmalar sonucu biyofilm, canlı veya cansız yüzeylerde bakterilerin kendi ürettikleri ekzopolisakkarit matriks içinde hareketsiz halde gömülü halde bulunan, yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş, birbirlerinden genetik ve protein yapısı olarak tamamen farklı Mikroorganizmalar ın oluşturduğu yapı olarak açıklanmıştır (Jayaraman ve Wood, 2008).

Her yüzey alanında bulunan topluluk formundaki Mikroorganizmalar biyofilm özelliği göstermemektedir. Biyofilmi oluşturan bakteriler planktonik formlardan farklı bir dış görünüş göstermektedir. Ama biyofilm oluşturmayan mikroorganizma yüzey alanında planktonik form özelliği göstermektedir. Planktonik formdaki bakterilerde biyofilm oluşturan Mikroorganizmalar ın geri dönüşümsüz yüzeye yapışma özelliği ve direnç yeteneği gözlenmemektedir. Biyofilm tabakasından ayrılan Mikroorganizmalar ın planktonik form özelliklerine geri dönmedikleri ve ayrıldıkları toplulukların özelliklerini taşıdıkları tespit edilmiştir (Davey ve O'toole, 2000).

Donlan (2002) yılında biyofilm halindeki Mikroorganizmalar ın planktonik formlarından üstün özelliklerini 4 ana başlık halinde ele alınmıştır. Bunlar:

1. Karbon, azot, fosfat gibi besin maddelerini bakteriler için ekstrasellüler polisakkarit çevrelerinden yoğunlaştırarak kullanıma hazır hale getirir.

2. Dezenfektan, antimikrobiyal ajanlara, konağın savunma sistemine, proteazlar, sıcaklık gibi koşullara biyofilm oluşturan Mikroorganizmalar direnç göstermektedir.
3. Biyofilm oluşturan mikroorganizmanın oluşturduğu tabakalı dizilim sayesinde yüzeyde bulunan Mikroorganizmaların mekanik koruma yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca salgıladıkları katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri iç taraftaki Mikroorganizmalar ı antimikrobiyallere karşı koruduğu görülmüştür.
4. Biyofilmden kopan parçaların planktonik formdaki Mikroorganizmaların yüzey alanına tutulmasına nazaran daha kolay tutulduğu kanıtlanmıştır (Donlan, 2002.)

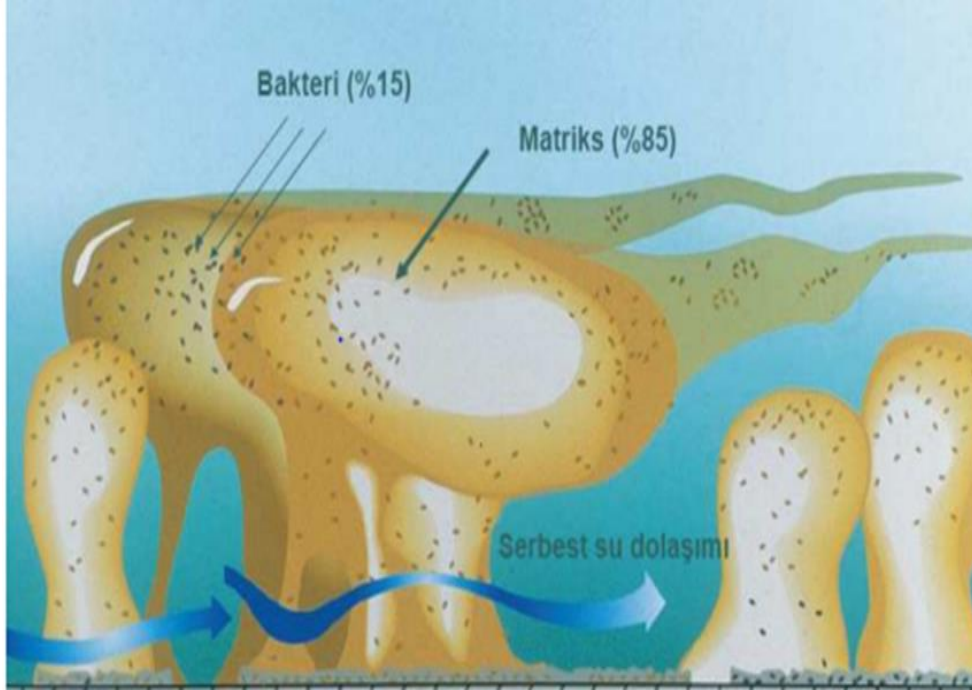
1.3.2 Biyofilmin Yapısı

Biyofilmin büyük bir kısmını su oluşturmaktadır. Biyofilmin üç boyutlu yapısı mikroskobik olarak incelendiğinde besin ve oksijen taşınmasına yardımcı olan su kanalları ve matriks içinde gömülü olarak bulunan Mikroorganizmalar ın oluşturduğu heterojen bir tabaka halinde olduğu görülmektedir (Fleming ve Winderger, 2010).

Matriksin içeriği ekzopolisakkarittir. Biyofilmlerin ekzopolisakkaritleri fiziksel ve kimyasal bakımdan farklılık göstermektedir. Ayrıca Mikroorganizmalar ın farklı türden olması ekzopolisakkarit yapısının yoğunluk ve genişlik açısında farklılık göstermesine neden olmaktadır. Biyofilmin ana maddesi olan ekzopolisakkarit, bakteriler tarafından salgılanır ve yapıyı antimikrobiyal ilaçlardan korur. Ekzopolisakkaritin yapısında ekstrasellüler DNA, lipit, protein ve metal iyonlar mevcuttur. Ekzopolisakkaritin kimyasal yapısı ise bakterinin büyüme evresi ve bulundukları çevre şartlarına göre değişiklik göstermektedir. Araştırmalar, ekzopolisakkarit yapının bozulmasının biyofilmin oluşumunu engellediğini göstermektedir.(Arar, 2015).

Biyofilmin oluşumu için yüzey, mikroorganizma ve glikokaliks bulunması yeterlidir. Ayrıca biyofilm aynı tür Mikroorganizmalar dan meydana geldiği gibi farklı tür Mikroorganizmalar ın da bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Farklı tür Mikroorganizmalar dan meydana gelen biyofilmden aynı tür Mikroorganizmalar ın oluşturduğu mikrokolonilere rastlanılmaktadır. Bu mikrokoloniler su kanalları yardımı ile ayrılmıştır. Su kanallarında devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlamaktadır (Davey ve O'toole, 2000).

Biyofilmin mikroskopik görüntüsü su kanallarının geçtiği mercan kayalıklarına veya mantar yapısına benzeyen bir görünüme sahiptir. Mercan kayası benzeri görünüm ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin biyofilmin ekstrasellüler yapısında toplanması ile meydana gelmektedir. Sonuç olarak biyofilm matriks içinde yaşamlarını devam ettiren hücrelerden oluşan; Mikroorganizmalar için gerekli olan besin moleküllerini, oksijenleri su kanalları ile taşıyan ve belli bir koordinasyon yeteneği bulunan çok tabakalı heterojen bir yapıdır. Hücrelerin matriksler içerisinde farklı yükseklikteki kule veya mantar yapıların içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm hacmi %15 hücre, %85 matriksden oluşmaktadır (Bothwell, Smith ve Phillips, 2003).



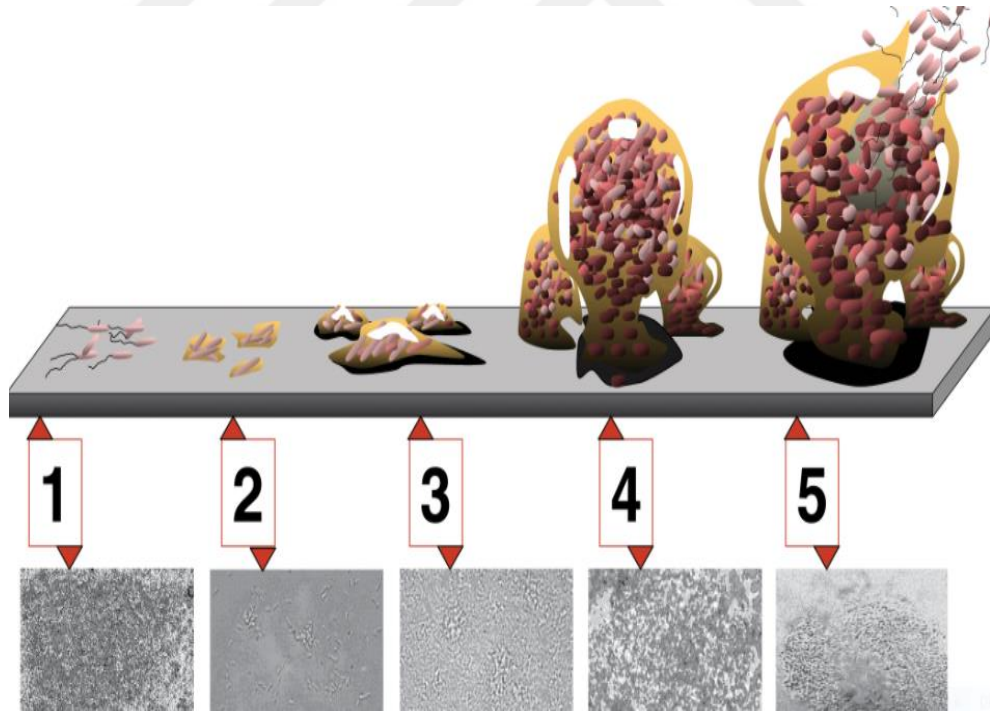
Şekil 1.7 Biyofilmlerin yapısal elementlerini oluşturan kule veya mantar benzeri kümelenmeyi gösteren mikro kolonilerin şematik görünümü (Bothwell, Smith ve Phillips 2003).

Biyofilm yapısının gelişme potansiyeli, çevresindeki besinleri kullanma imkanına, atıklarını uzaklaştırma potansiyeli quorum-sensing maddelerinin salınım miktarı, pH, oksijen perfüzyonu, üremesi ve karbon kaynağı ile yakından ilişkilidir. Bakteriler bir yüzeye yapıştıktan ve biyofilm oluşturulduktan sonra hafif durulama işlemi ile yapı

bozulmamaktadır. Biyofilm matriksinin içinde kan, kıl, çamur, minarel gibi hücresel olmayan yapılarada rastlanılmaktadır (Nadell, Xavier ve Foster, 2008).

1.3.3 Biyofilmin Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşum mekanizması kompleks bir mekanizmadır ve araştırmalar sonucu biyofilmin oluşumundan birçok genin sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Bu genlerin hücre duvarı yapımı, adezyon, quorum-sensing, metabolik aktivite, strese tepkide ve plazmide bağlanmada etkili olduğu ortaya konmuştur. Biyofilmin oluştuğu çevrede meydana gelen değişikliklerin genlerin ekspresyonlarına etki ederek biyofilm oluşumunu hızlandırdığı tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunu sağlayan gen materyalleri plazmidler aracılığı ile diğer bakterilere kolaylıkla transfer edilmektedir. Biyofilm oluşumuna etki eden bazı genler biyofilmin oluşumunu hızlandırırken bazıları ise yavaşlatmaktadır. Biyofilm oluşum mekanizması (Şekil 1.8) 5 basamakta gerçekleşmektedir (Vuong ve Otto, 2002).



Şekil 1.8 Biyofilm oluşumu 5 aşamada gerçekleşmektedir. 1. Tutunma, 2. Yapışma, 3. Olgunlaşma, 4. Kolonizasyon, 5. Kopma aşamalarını göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa* mikrografi eşleştirilerek verilmiştir (Monroe, 2007).

1.3.3.1 Tutunma

Biyofilm tabakasının ilk oluşum aşaması tutunmadır. Bakteriler bir yzeye tutunmaktadır. Tutulma eyleminden sonra biyofilm tabakasının dış gdrnüşünün ortaya çıkmasına neden olan genler aktif hale gelmektedir. Bakterilerin yzeye tutunmaları iwin yzeye temas ettiklerini anlamaları gerekmektedir (Arar, 2015).

Tutunma eyleminden sonra bakterilerin biyofilm oluşturma işlemine geemeleri, ‘quorum-sensing’ adı verilen haberleşme sisteminden gelen sinyallere bağlıdır. Quorum-sensing sistemi sayesinde bakterilerin poplasyon yoğunluğu tespit edilmektedir. Yzeye alanına tutunan her bir bakteri “Ben buradayım” sinyali veren molekller salgılamaktadır. Yzeye alanına tutunan mikroorganizma sayısı arttıkça salgılanan bu moleklün yoğunluğuda artar ve biyofilm oluşum mekanizması başlatılır. Mikroorganizmalar biyofilm tabakası iwerisinde hcre iwi sıvılar ve dūřuk molekl ağırlığına sahip haberciler ile haberleşerek biyofilm tabakasının oluşumunu hızlandırmaktadırlar (Shrout vd., 2011).

1.3.3.2 Yapışma

Mikroorganizmalar ın yzeye alanı ve birbirine tutulmasını sağlayan hcre zarında yer alan proteinlerin uyarılması sonucu ekzopolisakkarit madde salgılanmaktadır. Bu sayede yzeye yapışma artmaktadır. Salgılanan ekzopolisakkarit madde Mikroorganizmalar ı kwtu cewre koşullarından korumaktadır (İştar, 2018).

1.3.3.3 Kolonizasyon

Yzeye alana yapışma eylemi gercekleştiren bakteriler, blnnp gelişerek coğalma meydana getirmektedirler. Coğalan Mikroorganizmalar biyofilmin en kwcuk yapı taşı olan mikrokolonileri oluşturmaktadır. Bir bakteri yzeye alanına mikrokoloni oluşturduktan sonra diğer mikroorganizmalarda aynı alanda mikrokoloni meydana getirmektedir (Karaca, 2011).

1.3.3.4 Olgunlaşma

Kolonizasyon sonucu mikrokoloniler üremekte ve farklı yükseklikte mantar ya da kuleye benzeyen yapılar meydana getirmektedirler. Farklı yükseklikteki kuleler oluşturan mikrokoloniler arasında su kanalları oluşmaktadır. Oluşan su kanalları mikrokoloniler arasında besin molekülleri iletmek ve atık maddeleri uzaklaştırmada görevli ilkel bir dolaşım sistemi gibi görev yapmaktadır (Akyüz, 2019).

1.3.3.5 Kopma (Ayrılma)

Kopma evresi bakteri hücresinin tek olarak veya küme halinde biyofilmden ayrılması ile gerçekleşir. Ayrılma olayı dış kuvvetlerin etkisi ile olabileceği gibi biyofilmden hücre veya hücrelerin kopması şeklinde de meydana gelmektedir (Öztürk, Sakarya, Öncü ve Ertuğrul, 2008).

EPS üretimin azalması ya da durması, QS iletişimin durması veya besin miktarının ortamda azalması, enzim yapısının bozulması gibi nedenlerden kaynaklı olarak bakteriler biyofilmden ayrılma evresini gerçekleştirmektedir (Baselga, Albizu ve Amorena, 1994).

1.3.4 Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Bakteriler hem canlı hem de cansız ortamlarda biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bundan dolayı biyofilm oluşturma yeteneği bakterinin hareketliliği ve hücre duvar yapısı gibi özelliklere bağlı olduğu gibi yüzey alanın yapısı, besin miktarı, iyon yapısı, ortamın pH'ı ve sıcaklık gibi dış faktörlerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Pereni, Zhao, Liu ve Abel, 2006).

Mikroorganizmanın yüzey alanına tutunarak biyofilm oluşturmada yüzeyin pürüzlülüğüne, hidrofilik özelliğine, kimyasal yapısına ve elektriksel yüküne bağlıdır (McCarthy ve diğer., 2015). Yüzey alanın hidrofobik özelliği ile biyofilmin kopma evresi arasında pozitif korelasyon mevcuttur (Pereni vd., 2006).

Yapılan araştırmalar sonucunda yüzey alanının pürüzlülüğü, biyofilm oluşum basamaklarından tutulma evresinden daha çok biyofilmin ayrılmasını zorlaştırarak biyofilm yapısının oluşmasını sağladığı tespit edilmiştir (Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber ve Lappin-Scott, 1995).

Mikroorganizmaların bulundukları ortamın şartlarının olumsuzlaşması ile biyofilm oluşturma eğilimlerinin arttığı görülmüştür. Örneğin Mikroorganizmaların standart şartlara göre besin kıtlığı bulunan ortamda biyofilm oluşturma eğilimlerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002).

1.3.5 Biyofilm Oluşum Sebepleri

Mikroorganizmaların biyofilm oluşurmaya yönlendiren bazı nedenler mevcut olup bunlar řu şekilde sıralanabilir:

1.3.5.1 Savunma

Biyofilm yapısındaki Mikroorganizmalar besin kıtlığı, pH değişimi, fiziksel güç (kan akımı vb.), dezenfektan, antibiyotik ve radikallere karşı planktonik formlarından daha dirençlidirler. Biyofilm aslında Mikroorganizmalar ın strese karşı verdiği bir cevap biçimidir. Mikroorganizma mevcut olduğu çevredeki risk veya tehlikeyi sahip olduğu genlerin sinyalleri ile algılayıp savunma amaçlı olarak biyofilm oluşurmaktadır. Biyofilm yapısındaki ekzopolisakkarit molekülü mikroorganizmayı elektriksel çekim gücü alanlarından uzaklaştırarak savunma hücrelerinin fagositozundan korumaktadır (Costerton, Stewart ve Greenberg, 1999).

1.3.5.2 Adezyon ve Kolonizasyon

Vücudumuzda mikroorganizmaların yaşamaları ve üremeleri için gerekli olan oksijen, besin, ısı ve su gibi faktörler açısından uygun ortam mevcuttur. Vücudumuzun bazı bölgelerinde Mikroorganizmalar la kommensal bir yaşama müsaade edilmesine rağmen immün sistemimiz ve Mikroorganizmalar arasında sürekli bir savaş vardır.

Mikroorganizmalar ın yaşamları için uygun ortam olan vücudumuzda gerekli faktörlerin değişmesine rağmen yaşamlarını devam ettirebilmek için biyofilm oluşturmaktadırlar. Bunun için de ilk olarak vücudumuzun belli bir bölgesinde sabit kalması gerekmektedir (Gilmore, Srinivas, Akins, Hatter ve Gilmore, 2003).

Mikroorganizma yüzey proteinleri konağın elastin, fibrinojen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışarak adezyonu sağlamaktadır. Bu etkileşim mikroorganizmanın adezyonunda büyük önem taşımaktadır. Adezyon sağlandıktan sonra Mikroorganizmalar bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için üreme eylemi gerçekleştirirken bir yandan da biyofilm yapımına başlamaktadır. Biyofilm oluşumu mikroorganizmanın yapışmasını arttırmaktadır (Akyüz, 2019).

1.3.5.3 Yaşanabilir Çevre Geliştirme

Ortamda bulunan mikroorganizmanın kullanabileceği glikoz yoğunluğunun ekzopolisakkarit molekülünün gen ifadesini arttırdığı dolayısıyla biyofilm oluşumunu hızlandırdığı tespit edilmiştir (Ammendolia, Di Rosa, Montanaro, Arciola ve Baldassarri, 1999).

1.3.5.4 Komünite Oluşturma

Mikroorganizmalar ın çevreye adaptasyonları biyofilm oluşturma sıklıkları ile doğru orantılıdır. Çevresel faktörlere verdikleri cevapların aynı olması ve fenotip olarak farklı özellikler göstermeleri biyofilmi oluşturan Mikroorganizmalar ın kommensal yaşamının ispatı olarak gösterilmektedir (Chénier vd., 2003).

1.3.6 Biyofilm Oluşturma Avantajları

Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapısı mikroorganizmalara bir takım avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlardan bazıları:

1. Biyofilm, değişen çevre şartlarına karşı, örneğin; nem, pH gibi koşullara ve ultraviyole ışığının zararlarına direnç sağlayarak Mikroorganizmalar ı korumaktadır (Post, Stoodley, Hall–Stoodley ve Ehrlich, 2004).
2. Biyofilm oluşumu sırasında mikrokolonilerin çevresinde su kanalları adı verilen yapılar oluşmaktadır. Bu su kanalları sayesinde mikrokoloniler arasında besin ve madde alışverişı sağlandığı gibi metabolik atıkların atılmasına da yarar sağlar (Akyüz, 2019).
3. Mikroorganizmaların biyofilm yapısındaki ekzopolisakkarit maddeye gömülü halde bulunmalarından dolayı immün sisteme Mikroorganizmaların ulaşmasını ve fagositoz olmalarını engellemektedir. Diğer taraftan biyofilm oluşturan Mikroorganizmaların antibiyotiklere planktonik formlarından daha dirençli olmaları onlara avantaj sağlamaktadır (Donlan ve Costerton, 2002).
4. Biyofilm oluşturan Mikroorganizmalar, ortama salınan genler sayesinde planktonik forma geçebildikleri gibi çevre koşullarına karşı aynı cevabı vermektedirler. Ayrıca yatay gen transferi, Mikroorganizmaların genetik çeşitliliğini sağlar. Bu sayede çoklu antibiyotik direnci kazanmış Mikroorganizmalar ortaya çıkmaktadır (Davey ve O'toole, 2000).

BÖLÜM İKİ

YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bilim insanları son zamanlarda biyofilm tabakasının yapısı, oluşumu ve inhibe edilmesi ile ilgili araştırmalarını arttırmıştır. Bitkilerin farmakolojik özelliklerin göz önünde bulundurularak antibiyofilm çalışmaları bilim dünyasında hız kazanmıştır. Bitki ekstraktlarının antibiyofilm etkileri ile ilgili pek çok bilimsel çalışmaya örnek mevcuttur.

Balaban (2018), nar atıklarından farklı çözücülerle hazırladığı ekstraktlarının antibiyofilm etkisini araştırmıştır. Yaptığı çalışmada *Enterococcus faecalis* suşunun metanol: asit: su ve etanol: asit: su ile hazırladığı ekstraktlarda yüksek antibiyofilm etkisi tespit etmiştir. Yapılan çalışmada nar atıklarının gıdanın sanayisinde alternatif antibiyofilm olarak kullanılabileceği ön görülmüştür.

Denizli (2021) yaptığı araştırmada bipiridin ligandı içeren rutenyum bileşiğinin antibiyofilm etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mikroorganizması biyofilm tabakasını doza bağlı olarak %76 oranında inhibe etmiştir.

Karaca ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada metanolik makrofungus özütlerinin antibiyofilm etkisi araştırılmıştır. Araştırmada *Salmonella typhimurium* SL1344 suşunun biyofilmine en yüksek inhibe etkiği *Lentinus edodes* ve *Ganoderma lucidum* funguslarının ve en düşük inhibe etkisi ise *Lactarius deliciosus* fungusundan elde edilen ekstraktlardan sonuç alınmıştır. Yapılan çalışma sonucu antimikrobiyal etki gösteren ve tıbbi alanda kullanılan makrofungusların antibiyofilm etkisi sahip olduğu ve tıbbi alanda biyofilm inhibe edici olarak kullanılabilmesi için kanıt oluşturmuştur.

Balcı (2017), kekik yağlarının antibiyofilm etkisini araştırmıştır. Araştırma sonunda *Thymra spicata* var. *intricata* türü çalışılan *Streptococcus sanguinis* suşuna karşı yüksek antibiyofilm etkisi göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada *Mentha pulegium* uçucu yağının antibiyofilm etkisinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir.

Gürbüz (2019), *Arbutus andrachne* (Sandal Ağacı), *Jasminum nudiflorum* (Sarı Yasemin), *Cananga odorata* (Asya Ağacı), *Liquidambar orientalis* (Anadolu Sıla Ağacı) ve *Citrus bergamia* (Bergamot) bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibiyofilm etkisini araştırmıştır. Yapılan çalışmada *Cananga odorata* ve *Jasminum nudiflorum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibiyofilm çalışmasında en yüksek antibiyofilm etkisi tespit edilmiştir.. *Cananga odorata* bitkisinden elde edilen uçucu yağlar *Escherichia coli* ATCC 35200 50 g/ml, *Escherichia coli* ATCC 25922 50 g/ml ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 25 g/ml konsantrasyonlarında biyofilmi inhibe etmiştir.



BÖLÜM ÜÇ

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan malzeme ve cihazlar Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvar'ından temin edilmiş olmakla birlikte aynı laboratuvarda tez çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan malzeme ve cihazlar aşağıda açıklanmıştır.

3.1.1 Test Tüpleri

Borosilikat malzemeden üretilmiş 12x75 mm boyutlarında ve 15 ml hacime sahip test tüpleri kullanılmıştır. Test tüpleri stok Mikroorganizmalar ın standart miktarını sağlamak için McFarland yöntemi uygulanırken kullanılmıştır. Test tüpleri kullanılmadan önce sterilize edilmişlerdir.

3.1.2 Öze

Bu çalışmada metal öze kullanılmıştır. Metal öze çalışmaya başlamadan önce otoklavda sterilize edilmiş ve tez çalışması boyunca yapılan tüm işlemlerden sonra elektrikli bekte sterilizasyonu sağlanmıştır. Metal öze McFarland yöntemi uygulanırken kullanılmıştır.

3.1.3 Filtre Kâğıdı

Bu çalışmada 110 mm çapında Whatman No.1 filtre kâğıdından yararlanılmıştır. Filtre kâğıdı tez çalışmasında kullanılan bitki ekstraktlarının süzülme işlemi sırasında kullanılmıştır.

3.1.4 Enjektör Filtresi

Steril 0,45 µm'lik enjektör filtreler kullanılmıştır. Enjektör filtreler endemik bitkilerden hazırlanan su ekstraktlarının kontaminasyon riskine karşı sterilliğini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.5 Enjektör

Bitki ekstraktının filtreden geçirilmesi sırasında 5 ml'lik steril enjektörler kullanılmıştır.

3.1.6 Steril Mikropipet Uçları

Otomatik mikropipetlerde kullanılmak üzere 10 µL-100 µL ve 100 µL-1000 µL pipetlere uygun pipet uçları steril edilip kullanılmıştır.

3.1.7 96 Kuyucuklu Mikroplakalar

U tabanlı 300 µL hacimli 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır.

3.1.8 Falcon Tüpler

Bitki ekstraktlarını saklamak amacıyla düz tabanlı, 30x115 mm çapında, saf polipropilenden üretilmiş falcon tüpler kullanılmıştır.

3.1.9 Otomatik Mikropipetler

Bitki ekstraktları, besiyerleri ve mikroorganizmaları mikroplakalara eşit miktarda koymak için 10 µL-100 µL ve 100 µL-1000 µL'lik mikropipetler kullanılmıştır.

3.1.10 Cam Şişeler

Besiyerinin hazırlanmasında 500 mL ve 1000 mL hacimli, otoklavlanabilir özelliğe sahip vida kapaklı cam şişeler kullanılmıştır.

3.1.11 Cam Erlenler

Endemik bitkilerden hazırlanacak olan su bazlı ekstaraktların çalkalanma işleminde ısı ve kimyasal dayanıklılığa sahip cam erlenler kullanılmıştır.

3.1.12 Distile Su

Tez çalışmasında kullanılacak olan endemik bitkilerin çözülmesi, besiyerinin hazırlanması ve kullanılan malzemelerin temizlenmesinde cihazdan elde edilen distile su kullanılmıştır.

3.1.13 Serum Fizyolojik

McFarland işlemi sürecinde Mikroorganizmalar ı standardize etmek amacıyla %0,9 w/ v serum fizyolojik steril edilip kullanılmıştır.

3.1.14 Luria Bertani Broth

Tez çalışmasında 96 kuyucuklu mikrolatelerde mikroorganizmanın çoğaltılması işleminde besiyeri amacıyla kullanılmıştır.

3.1.15 Kristal Viyole

Antibiyofilmin belirlenmesi aşamasında mikropalak kuyucuklarında meydana gelmiş biyofilm içerisindeki Mikroorganizmalar ın boyanması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.16 Aseton

Biyofilm tabakasını belirlemek için kullanılan kristal viyole boyasının çözücüsü %99 saflıkta aseton kullanılmıştır.

3.1.17 Glikoz Monohidrat

Mikroorganizmanın biyofilm oluşturmaları için kullanılmıştır.

3.1.18 Parafilm

İnkübasyon sürecinde hazırlanan mikrop-lakların içerisinde bulunan besiyerinin kurumaması amacıyla mikrop-lakların dış yüzeyleri parafilm ile sarılmıştır

3.1.19 Etil Alkol

Mikrop-lakalarda oluşan biyofilm tabakasını boyamak amacıyla kullanılan kristal viyole boyasının çözücüsü olarak %99'luk saf etil alkol kullanılmıştır.

3.1.20 Maske

Mikroorganizmalar la yapılan çalışmalarda iş sağlığı ve güvenlik amacıyla kullanılmıştır.

3.1.21 Muayene Eldiveni

Deney süresince iş sağlığı ve güvenliğini sağlamak ayrıca testin kontaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılmıştır.

3.2 Cihazlar

3.2.1 Biyogüvenlik Kabini

Bakterilerin kullanıldığı antibiyofilmler testleri ve McFarland testlerinin işlemlerinin tamamı iş sağlığı ve güvenliği nedeniyle HEPA filtreli 2. seviye biyogüvenlik kabininin içinde yapılmıştır.

3.2.2 Otoklav

Mikroorganizmalar için hazırlanan besiyeri ve deneyde kullanılacak malzemeler steril edilmesi amacıyla 121 °C’de 15 dakika süresince otoklava koyulmuştur.

3.2.3 Etüv

96 kuyucuklu mikrolakalara koyulan Mikroorganizmalar biyofilm oluşturmaları için etüv içinde inkübe edilmiştir.

3.2.4 Liyofilizatör

Endemik bitkilerden hazırlanan su doldurarak kurutmak amacıyla liyofilizatör kullanılmıştır.

3.2.5 Mikrolaka Okuyucu

Endemik bitkilerden elde edilen su ekstraktlarının derişimlerinin Mikroorganizmalar a ve antibiyofilme etkisini analiz etmek için mikrolaka okuyucusu kullanılmıştır.

3.2.6 Orbital alkalayıcı

Endemik bitkilerden ekstrakt elde etmek amacıyla su bitki karışımı erlenlerde orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek çalkalanmıştır.

3.2.7 Hassas Terazı

Test için hazırlanacak kimyasalların ve besiyerinin tartımında kullanılmıştır.

3.2.8 Densitometre Cihazı

McFarland 0.5 standartına uygunluğunun tespiti için mikroorganizma bulanıklığının ölçümünde densitometre cihazı kullanılmıştır.

3.2.9 Elektronik Bek

Test tüplerinden mikropalakaya mikroorganizma aktarımı sırasında test tüplerinin steril hale getirmesi için biyogüvenlik kabini içinde elektronik bek kullanılmıştır.

3.3 Bitki Materyalleri

Bu çalışmada üç endemik bitki kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkiler Dr Mustafa Eray BOZYEL tarafından toplanılmış ve teşhis edilmiştir. Kullanılan endemik bitkilerin bilimsel adları, familyaları ve lokasyon bölgesine ait bilgiler Tablo 3.1’te verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan endemik bitki bilgileri

Bilimsel Adı	Familyası	Halk dilindeki ismi	Toplandığı Yer	Kullanılan kısımları
<i>Achillea fraasii</i>	<i>Astereacea</i>	Çen civanperçimi	Kazdağları Çanakkale	Çiçek, gövde, kök
<i>Sideritis trojona</i>	<i>Lamiaceae</i>	Kazdağı çayı	Kazdağları Çanakkale	Çiçek, göve, kök
<i>Galanthus trojonus</i>	<i>Amaryllidoideae</i>	Truva kardeleni	Balaban tepesi yakını	Çiçek, gövde, kök

3.4 Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında Tablo 3.2. de belirtilen endemik bitkilerin antibiyofilm aktivitesini belirlemek amacıyla 3 standart suş, 1 gıda izole suş ve 1 klinik izole sistemi ile çalışan suş kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Tez çalışmasında kullanılan Mikroorganizmalar ın özellikleri

Mikroorganizma Suşların İsimleri	Mikroorganizmaların Gram Türleri ve Şekilleri
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	Gram pozitif, çubuk
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram negatif, çubuk
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Gram pozitif, çubuk
<i>Listeria innocua</i>	Gram pozitif, çubuk
<i>Escherichia coli</i> 1214816	Gram negatif, çubuk

ATCC, mikroorganizmanın Amerikan Türlü Kültür Koleksiyonu olduğu belirtir.

DSMZ, mikroorganizmanın Alman Hücre Kültürü ve Mikroorganizma Koleksiyonu olduğunu belirtir.

Bu çalışmada kullanılmak amacıyla standart suşlar olarak gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis* DSMZ 1971, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve gram negatif bakterisi olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 seçilmiştir.

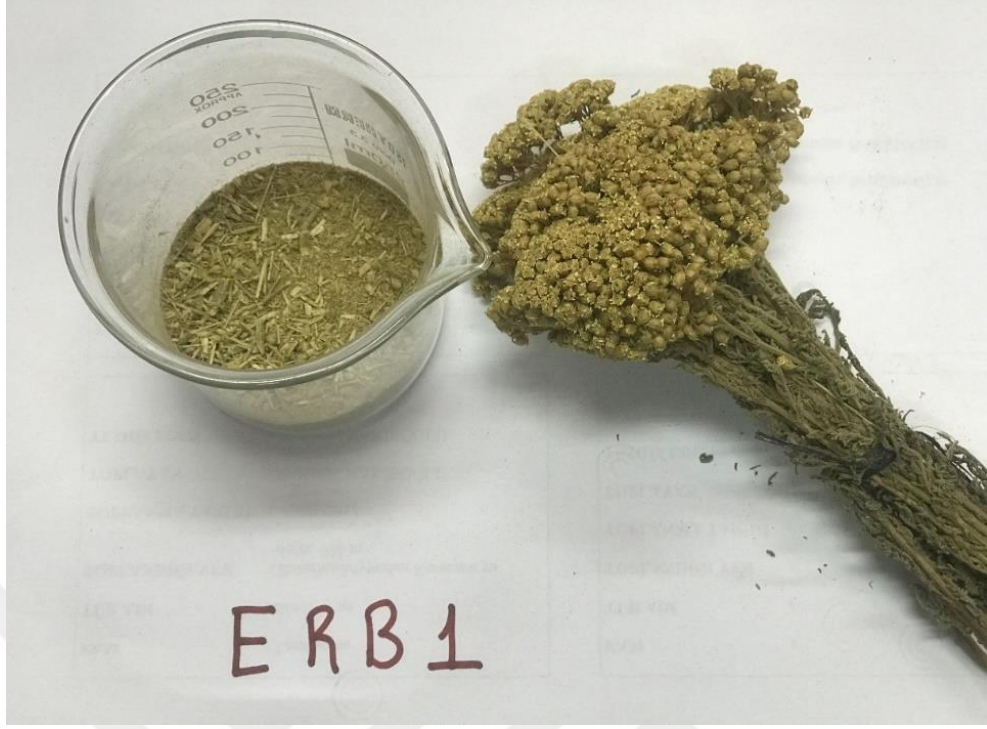
Bu çalışmada kullanmak amacıyla gıda izole suş olarak gram pozitif bakteri *Listeria innocua* seçilmiştir.

Bu tez çalışmasında gram negatif suş *Escheria coli* 1214329 kullanılmak üzere seçilmiştir.

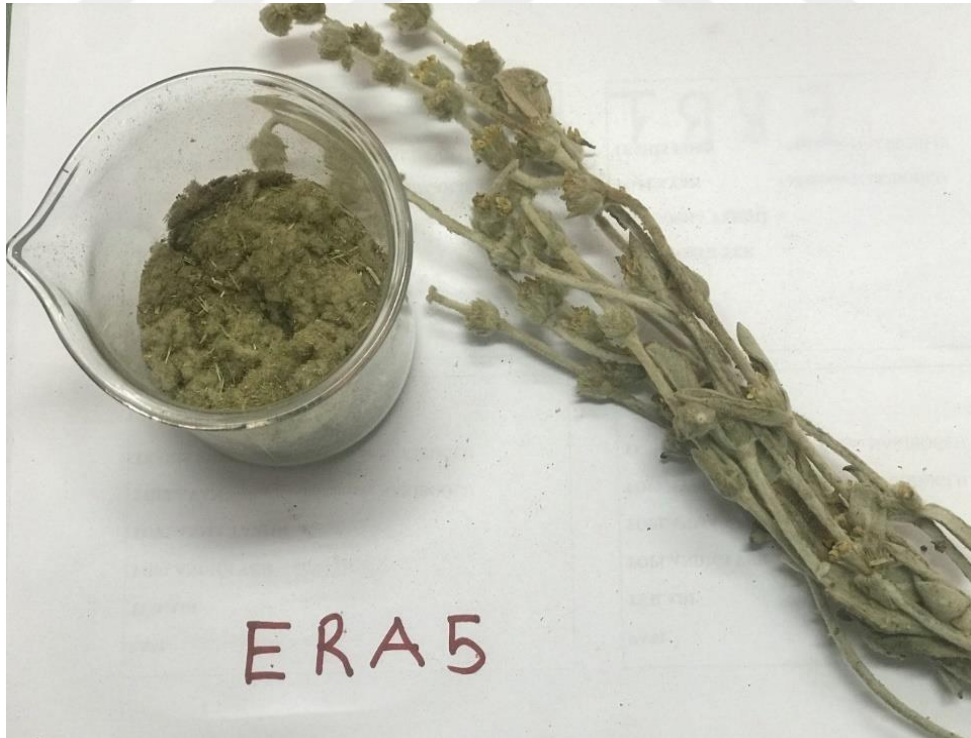
Tez çalışmasında kullanılan Mikroorganizmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvar'ından temin edilmiştir.

3.5 Endemik Bitkilerden Etken Madde Ekstraksiyonun Hazırlanması

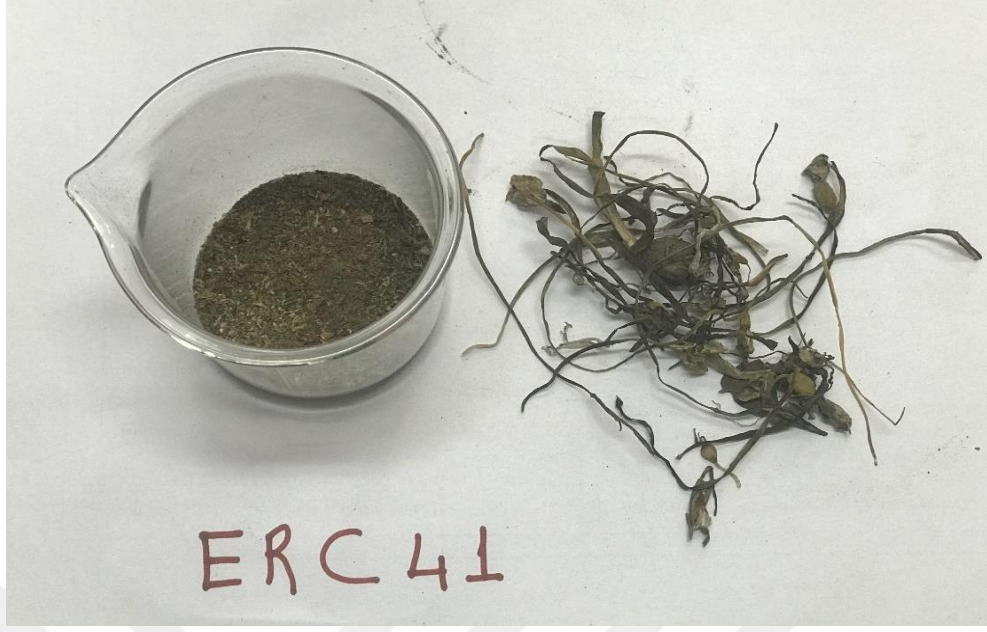
Bu tez çalışmasında kullanılacak olan endemik bitkiler toplanıp teşhis edildikten sonra kurutma işlemi yapılmıştır. Kurutulmuş endemik bitkiler çözücü etken maddenin içinde daha iyi çözülmesi için mutfak robotunda parçalama işlemi uygulanmıştır. Örnek olarak bitkilerin kurumuş halleri ve öğütülmüş fotoğrafları Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te verilmiştir. (Benek, Şenturan, Şimşek, Canlı ve Altuner, 2021).



Şekil 3.1 *Achillea fraasii* örneğinin kurutulmuş görünüşü ve öğütülmüş hali (Kişisel Arşiv, 2021)



Şekil 3.2 *Sideritis trojona* örneğinin kurutulmuş görünüşü ve öğütülmüş hali (Kişisel Arşiv, 2021)



Şekil 3.3 *Galanthus trojonus* örneğinin kurutulmuş görünüşü ve öğütülmüş hali (Kişisel Arşiv, 2021)

Deneyler kullanılacak olan endemik bitki örnekleri robottan öğütüldükten sonra 1000 mL hacimli cam erlenlere aktarılıp, üzerine 200 mL distile su eklenmiştir (Şekil 3.4). Endemik bitki örnekleri ve distile su bulunan cam erlenler orbital çalkalayıcıya koyularak 48 saat 60 rpm’de oda sıcaklığında çalkalamaya bırakılmıştır (Şekil 3.5) (Altuner, Canlı ve Akata, 2014)



Şekil 3.4 Çalışılacak örneklerin distile su eklenmiş görüntüsü (Kişisel Arşiv, 2021)



Şekil 3.5 Orbital çalkalayıcıya yerleştirilmiş bitki ekstraktları çalkalama süreci (Kişisel Arşiv, 2021)

Antibiyofilm testinde kullanılacak olan endemik bitki ekstraktları 48 saat çalkalama işleminden sonra filtre kâğıdı yardımı ile cam balonların içerisine süzölmüştür (Şekil 3.6). Süzölme işlemi tamamlanan ekstraktlar -80 °C bir gün dondurulmaya

bırakılmıştır. Donmuş olan bitki ekstraktları liyofilizatör cihazına takılıp buz kristallerini direkt gaz haline geçirerek örneğin içerisindeki su uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.6 Endemik bitki örneklerinin süzülme işlemi (Kişisel Arşiv, 2021)



Şekil 3.7 Liyofilizatörden suyun uzaklaştırılması (Kişisel Arşiv, 2021)

Liyofilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra cam balonların içindeki su uzaklaştırılmış örneklerin hassas terazide ölçümleri alınmıştır. Bu sayede antibiyofilm testinde kullanılacak bitki ekstraktı içindeki madde elde edilen sonuçlar Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

Tablo 3.3. Bitki ekstraktlarının madde miktarı

Bitki materyali	Miktar	Madde Miktarı
<i>Galanthus trojanus</i>	15 mL	0,526 g
<i>Achillea fraasii</i>	15 mL	2,583 g
<i>Sideritis trojana</i>	15 mL	0,781 g

3.6 Mikroorganizmalar ın standardizasyonu

Antibiyofilm testinde kullanılacak Mikroorganizmalar standardizasyonu için 0,5 McFarland değerinde ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılacak olan Mikroorganizmalar serum fizyolojik çözelti içine öze yardımı ile aktarılmış ve densitometre cihazı kullanılarak bulanıklık ölçümü yapılmıştır. Farland 0,5 bulanıklık standardizasyonu sağlanır. Cam tüplerde canlı mikroorganizma miktarı 1×10^7 / 1×10^8 cfu/mL arasında olmaktadır.

3.7 Besiyerlerinin hazırlanması ve inokülasyonu

Mikroorganizmalar ın çoğalması amacıyla Luria Bertani hazırlanmıştır. LB broth besiyerini hazırlamak için toz haldeki LB broth'dan 12 gr hassas terazide tartılarak 500 mL'lik cam balona aktararak üzerine 300 mL distile su eklenmiştir. Hazırlanan sıvı besiyeri şişesi 121°C'de 1.5 atm basınçlı otoklava koyularak 15 dakika steril edilmiştir.

Hazırlanan sıvı LB broth, altı farklı glikoz konsantrasyonunda besiyeri hazırlamak için steril edilmiş cam tüplere aktararak üzerlerine farklı miktarda (%0, %0,5, %1, %1,5, %2, %2,5 glikoz) glikoz monohidrat eklenen cam tüplerdeki sıvı besiyerleri

121°C’de 1.5 atm basınçlı otoklav cihazında 15 dakika steril edilmiştir. Cam tüplere 10 mL miktarında hazırlanan sıvı besiyerlerinde bulunan glikoz konsantrasyonu Tablo 3.4 verilmiştir.

Tablo 3.4 LB Borth besiyerinde bulunan glikoz konsantrasyonu

Konsantrasyonu miktarı	%0	%0,5	%1	%1,5	%2	%2,5
10 ml’de glikoz monohidrat miktarı	0	0,05 g	0,1 g	0,15 g	0,2 g	0,25 g

3.8 Etil Alkol – Aseton Karışımı Hazırlama

Mikroplakalarda biyofilmi oluşturan Mikroorganizmalar ın boyanması için kullanılan kristal viyole boyasının miktarının belirlenmesi amacıyla çözücü olarak %30 aseton, %70 etil alkol çözeltisi kullanılmıştır. Steril edilmiş cam bir şişeye 300 mL aseton ve 700 mL etil alkol koyularak aseton-etil alkol çözeltisi hazırlanmıştır (Benek, 2020).

3.9 Kristal Viyole Boyası Hazırlanması

Mikroplaklarda oluşan biyofilm tabakasındaki Mikroorganizmalar ın miktarının belirlenmesi için kullanılacak kristal viyole, 100 mL etil alkol içine hassas terazide 0,1 g koyularak hazırlanmıştır (Sandasi, Leonard ve Viljoen, 2010).

3.10 Biyofilm Oluşum Şartlarının Belirlenmesi

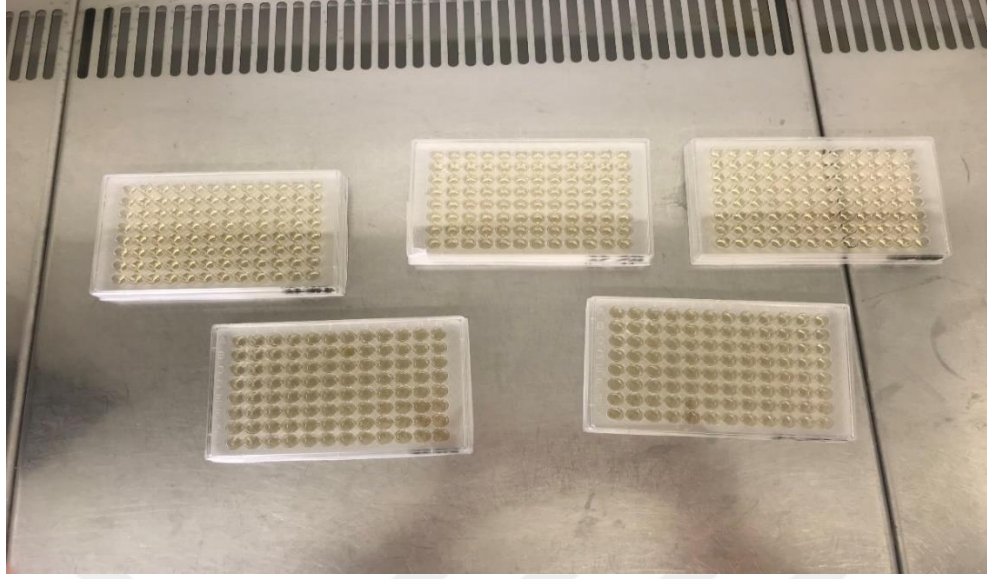
Bu çalışmada kullanılacak olan endemik bitkilerin antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi amacıyla deneyde kullanılacak olan 5 mikroorganizma için altı farklı glikoz konsantrasyonunda (%0, %0,5, %1, %1,5, %2, %2,5) sıvı LB broth besiyeri hazırlanmıştır. Her suş için 24 ve 48 saat için inkübe edilecek 2 mikropilaka yükleme

yapılmıştır. Mikroplaka yüklemesinde her bir kuyucuğa 100'er mikrolitre farklı konsantrasyondaki besiyeri konulmuştur. Tablo 3.5'teki gibi mikroplaklara besiyeri ve mikroorganizma yüklenmiştir.

Tablo 3.5 Mikroorganizmaların biyofilm saptama için yüklemesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş	%0+ Suş
B	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş	%0, 5+ Suş
C	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1+ suş
D	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş
E	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş	%2+ Suş
F	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş
G	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş	%0+ suş
H	%0+ suş	%0+ suş	%0, 5+ suş	%0, 5+ suş	%1+ suş	%1+ suş	%1, 5+ suş	%1, 5+ suş	%2+ suş	%2+ suş	%2, 5+ suş	%2, 5+ suş

G ve H satırları negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. G satırına pozitif kontrol olarak kuyucuklara %0 konsantrasyona sahip besiyeri ve mikroorganizma yüklenmiştir. H satırına negatif kontrol olarak her iki kuyucuğa farklı glikoz konsantrasyonuna sahip besiyeri yüklenerek kontrol sağlanmıştır. Yükleme yapılan biyofilm plaka örnekleri Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8 Biyofilm oluşumunu saptamak için örnek mikropalak yüklenmesi (Kişisel Arşiv, 2021)

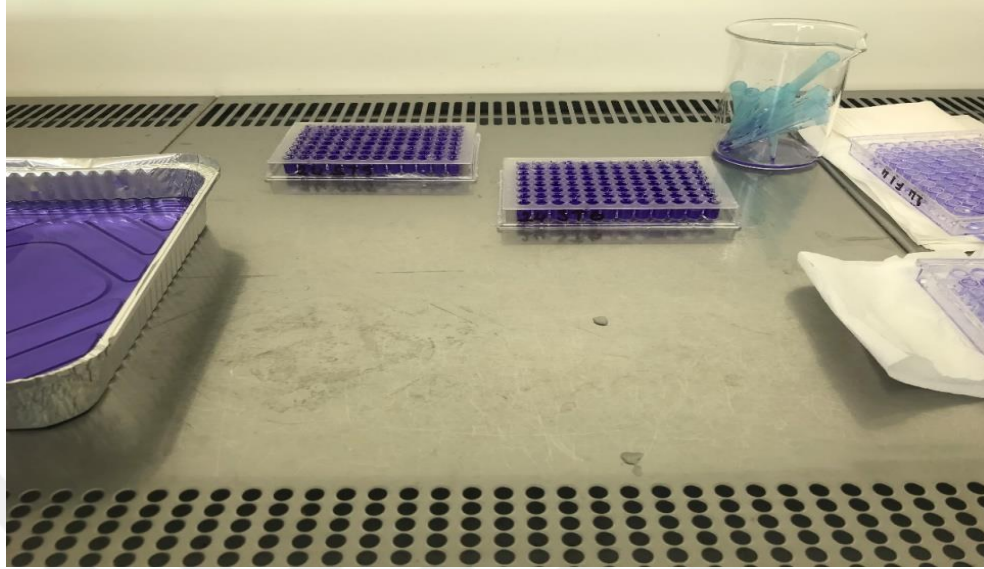
Yükleme yapılan mikropalaklar 37°C'de 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra mikropalaklarda oluşan 24 saatlik biyofilmleri gözlemlemek için mikropalakların içi dikkatli bir şekilde boşaltılmış ve distile su ile yıkanmıştır (Şekil 3.9). Yıkama işleminde mikropalakalar 45°lik açı ile yavaşça daldırılıp çıkarılmıştır.



Şekil 3.9 Yıkama işlemi yapılan mikropalaka (Kişisel Arşiv, 2021)

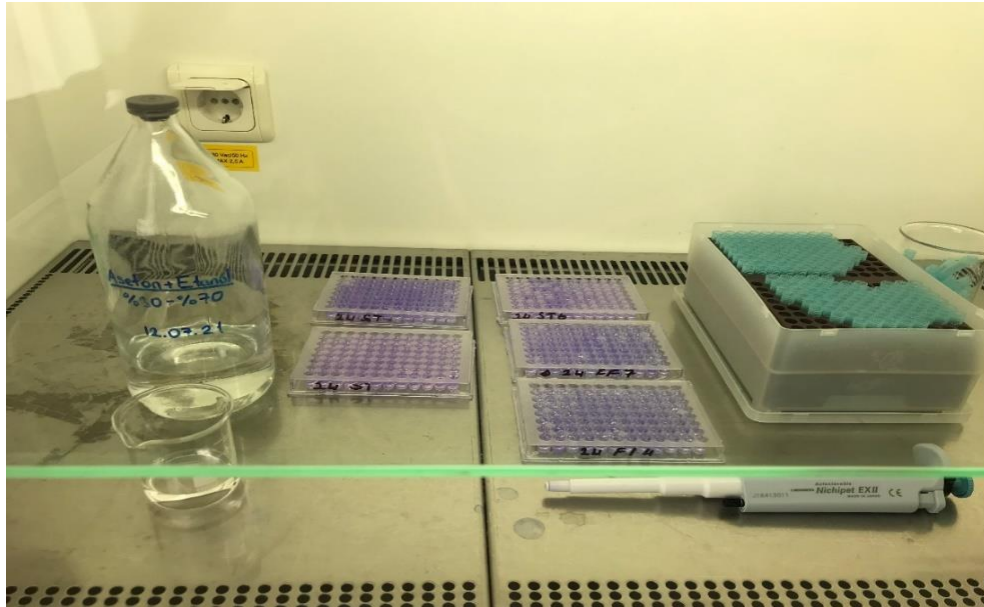
Bu işlem sonrası mikropalakalar kurumaya bırakılmış daha sonra kuruyan mikropalakaların her bir kuyucuğuna 225 µL kristal viyole çözeltisi konarak 15 dakika

eklenmiştir (Şekil 3.10). Bekleme işleminden sonra kristal viyole çözeltisi dökülerek mikroplakalara distile su ile yıkama işlemi yapılmış ve kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.10 Kristal viyole yüklenmiş mikroplakalar (Kişisel Arşiv, 2021)

Kuruyan mikroplaklara %30 aseton- %70 etil alkol oranında bulunan çözeltiden 225 µL koyularak 15 dakika bekletilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Aseton – Etanol karışımının mikroplakaya aktarımı (Kişisel Arşiv, 2021)

Bekleme süresi sonunda temiz mikrolaklara etil alkol aseton çözeltisi mikropipet yardımı ile aktarılıp mikrolaka okuyucu cihazında 550 nm’de ölçümleri alınmıştır. Aynı işlemler 37°C’de 48 saat inkübe edilen mikrolaklarda uygulanmıştır.

İnkübasyon ve yıkama işlemi sonunda elde edilen 24 ve 48 saatlerine ait mikrolaka okuyucu ölçümleri, standart sapma, aritmetik ortalama ve ortancaları hesaplanarak karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saatlerine ait tez çalışmasında kullanılan Mikroorganizmaların mikrolaka okuyucu ölçümleri ve istatistiksel verileri Tablo 3.6, Tablo 3.7, Tablo 3.8, Tablo 3.9, Tablo 3.10, Tablo 3.11, Tablo 3.12, Tablo 3.13, Tablo 3.14, Tablo 3.15, Tablo 3.16, Tablo 3.17, Tablo 3.18, Tablo 3.19, Tablo 3.20, Tablo 3.21, Tablo 3.22, Tablo 3.23, Tablo 3.24 ve Tablo 3.25’te verilmiştir.

Tablo 3.6 *Escherichia coli* 1214329 suşunun 24 saatlik mikrolaka okuyucunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,013	0,017	0,060	0,060	0,029	0,066	0,052	0,060	0,044	0,034	0,027	0,020
B	0,019	0,020	0,017	0,015	0,027	0,010	0,057	0,023	0,046	0,017	0,062	0,020
C	0,076	0,025	0,069	0,020	0,020	0,089	0,135	0,026	0,013	0,049	0,022	0,037
D	0,018	0,081	0,072	0,02	0,042	0,091	0,048	0,050	0,015	0,009	0,049	0,021
E	0,049	0,073	0,029	0,08	0,052	0,044	0,047	0,054	0,062	0,028	0,074	0,014
F	0,068	0,032	0,084	0,035	0,065	0,027	0,048	0,059	0,045	0,078	0,047	0,077
G	0,054	0,029	0,036	0,057	0,015	0,050	0,037	0,026	0,015	0,021	0,006	0,016
H	0,038	0,060	0,011	0,039	0,044	0,008	0,004	0,098	0,019	0,019	0,092	0,021

Tablo 3.7 *Escherichia coli* 1214329 suşunun 48 saatlik mikropilaka okuyucunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,135	0,309	0,236	0,129	0,434	0,339	0,364	0,400	0,249	0,389	0,351	0,342
B	0,066	0,648	0,349	0,235	0,324	0,164	0,124	0,216	0,125	0,136	0,231	0,056
C	0,070	0,569	0,375	0,56	0,425	0,363	0,669	1,018	0,276	0,445	0,361	0,171
D	0,699	0,570	0,644	0,509	0,340	0,435	0,439	0,309	0,392	1,299	0,521	0,315
E	0,082	0,532	0,491	0,481	0,424	1,077	0,790	0,300	1,134	0,666	0,215	0,543
F	0,095	0,388	0,715	0,517	0,363	0,401	0,359	0,581	0,814	0,934	0,341	0,172
G	0,395	0,943	0,359	0,420	0,487	0,428	0,813	0,530	0,456	0,491	0,497	0,925
H	0,239	0,492	0,213	0,244	0,307	0,294	0,893	0,757	0,258	0,529	0,889	1,205

Tablo 3.8 *Escherichia coli* 1214329 suşunun 24 saatlik istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,04075	0,039	0,015499
%0,5	0,023625	0,02	0,00962
%1	0,0405	0,0315	0,021941
%1,5	0,04	0,045	0,018966
%2	0,05125	0,0505	0,012915
2,5	0,0555	0,0535	0,014041

Tablo 3.9 *Escherichia coli* 1214329 suşunun 48 saatlik istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,322375	0,3405	0,054348
%0,5	0,194375	0,19	0,070059
%1	0,42175	0,4	0,10136
%1,5	0,48125	0,474	0,098963
%2	0,528375	0,5115	0,148471
%2,5	0,458125	0,3945	0,133803

Tablo 3.10 *Listeria innocua* suşunun 24 saatlik mikropilaka okuyucusunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,006	0,024	0,025	0,008	0,002	0,046	0,055	0,047	0,010	0,024	0,002	0,014
B	0,007	0,027	0,045	0,01	0,023	0,02	0,049	0,084	0,054	0,021	0,055	0,092
C	0,022	0,009	0,011	0,014	0,034	0,053	0,023	0,009	0,022	0,037	0,058	0,056
D	0,013	0,03	0,032	0,031	0,042	0,018	0,042	0,016	0,081	0,060	0,037	0,059
E	0,047	0,056	0,022	0,009	0,016	0,034	0,127	0,021	0,096	0,056	0,061	0,063
F	0,048	0,079	0,056	0,023	0,106	0,063	0,073	0,129	0,066	0,085	0,073	0,096
G	0,061	0,035	0,020	0,057	0,058	0,037	0,036	0,061	0,056	0,009	0,007	0,020
H	0,010	0,047	0,012	0,026	0,013	0,019	0,115	0,046	0,066	0,026	0,026	0,028

Tablo 3.11 *Listeria innocua* suşunun 48 saatlik mikropate reader cihaz ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,372	0,406	0,384	0,580	0,475	0,666	0,756	0,976	0,167	0,896	0,261	0,282
B	0,378	0,176	0,134	0,597	0,145	0,215	0,210	0,217	0,961	1,048	1,072	0,65
C	0,461	0,447	0,608	0,740	1,019	1,136	0,197	0,387	0,975	1,254	0,346	0,317
D	0,267	0,563	0,468	0,905	0,762	0,692	0,261	1,248	0,901	1,249	0,935	0,926
E	0,211	0,612	0,105	0,168	0,321	0,869	0,796	1,200	1,193	1,312	1,306	0,855
F	0,144	0,570	0,652	0,649	0,211	0,259	0,285	1,005	0,609	0,365	0,959	1,669
G	0,703	0,724	0,294	0,441	0,611	0,308	0,246	1,182	1,065	0,989	0,374	1,387
H	0,217	0,379	0,389	0,611	0,442	0,422	0,700	0,724	1,937	0,728	0,886	1,018

Tablo 3.12 *Listeria innocua* suşunun 24 saatlik mikropakanın istatistik verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,019625	0,019	0,013136
%0,5	0,03675	0,036	0,015406
%1	0,027	0,0225	0,013711
%1,5	0,036375	0,0345	0,011963
%2	0,045	0,0515	0,017121
%2,5	0,073875	0,073	0,012766

Tablo 3.13 *Listeria innocua* suşunun 48 saatlik mikrop lakanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,490125	0,4405	0,162804
%0,5	0,4255	0,2975	0,284179
%1	0,622875	0,5345	0,263026
%1,5	0,769	0,8315	0,180135
%2	0,757125	0,8255	0,362383
%2,5	0,5435	0,5895	0,233042

Tablo 3.14 *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşunun 24 saatlik mikrop laka okuyucunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,034	0,011	0,040	0,064	0,055	0,023	0,020	0,073	0,11	0,061	0,037	0,024
B	0,039	0,051	0,053	0,047	0,04	0,061	0,067	0,016	0,051	0,042	0,023	0,023
C	0,022	0,037	0,052	0,046	0,067	0,066	0,055	0,089	0,05	0,059	0,045	0,048
D	0,029	0,046	0,047	0,06	0,057	0,073	0,072	0,02	0,029	0,053	0,037	0,029
E	0,050	0,064	0,007	0,049	0,067	0,09	0,074	0,074	0,053	0,050	0,048	0,034
F	0,039	0,068	0,103	0,085	0,068	0,066	0,066	0,038	0,060	0,056	0,059	0,044
G	0,057	0,073	0,056	0,063	0,085	0,075	0,063	0,102	0,032	0,052	0,038	0,098
H	0,038	0,053	0,084	0,064	0,070	0,073	0,086	0,117	0,042	0,095	0,029	0,088

Tablo 3.15 *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşunun 48 saatlik mikrop lala okuyucunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,366	0,629	0,338	0,668	0,254	0,359	0,368	0,515	0,181	0,868	0,445	0,75
B	0,791	1,177	0,539	0,818	1,411	1,49	0,378	0,996	0,313	1,377	1,468	1,297
C	1,428	1,285	0,57	1,152	1,168	1,232	0,694	0,907	1,168	1,023	1,096	0,675
D	1,039	1,064	1,151	1,365	1,157	1,25	1,086	1,026	0,893	1,022	1,135	0,932
E	0,987	1,159	1,071	1,416	1,223	1,262	1,413	1,186	1,196	1,605	0,524	0,463
F	1,413	1,486	1,7	0,753	1,388	0,855	1,515	1,262	1,109	0,285	0,86	0,969
G	0,359	0,791	0,771	0,996	0,749	1,307	0,781	0,712	0,988	0,751	0,902	0,719
H	0,567	0,217	1,199	0,796	1,146	0,781	1,066	1,237	0,31	1,054	0,921	0,759

Tablo 3.16 *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşunun 24 saatlik mikrop lakanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,03675	0,0355	0,014983
%0,5	0,04325	0,0445	0,00978
%1	0,052625	0,051	0,010384
%1,5	0,04475	0,0465	0,012033
%2	0,060556	0,053	0,014458
%2,5	0,060875	0,063	0,008167

Tablo 3.17 *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşunun 48 saatlik mikrop lakanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,461	0,4065	0,129533
%0,5	1,05075	1,0865	0,316075
%1	1,055	1,124	0,177766
%1,5	1,096625	1,075	0,078384
%2	1,187125	1,191	0,126671
%2,5	1,16775	1,1855	0,254755

Tablo 3.18 *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun 24 saatlik mikrop laka okuyucunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,011	0,008	0,024	0,037	0,027	0,007	0,032	0,008	0,045	0,031	0,021	0,008
B	0,028	0,034	0,046	0,047	0,045	0,035	0,034	0,05	0,038	0,024	0,024	0,006
C	0,009	0,028	0,034	0,037	0,037	0,038	0,018	0,038	0,015	0,009	0,009	0,014
D	0,009	0,019	0,037	0,035	0,039	0,076	0,022	0,018	0,025	0,014	0,012	0,010
E	0,012	0,032	0,05	0,029	0,064	0,087	0,049	0,046	0,059	0,085	0,042	0,029
F	0,031	0,026	0,108	0,045	0,025	0,106	0,114	0,058	0,049	0,021	0,063	0,087
G	0,027	0,040	0,088	0,093	0,080	0,005	0,033	0,039	0,018	0,041	0,002	0,015
H	0,014	0,048	0,055	0,001	0,028	0,035	0,039	0,041	0,034	0,014	0,008	0,022

Tablo 3.19 *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun 48 saatlik mikropilaka okuyucusunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,539	0,407	0,487	0,397	0,467	0,564	0,547	0,287	0,417	0,444	0,43	0,47
B	0,682	0,215	0,495	0,39	0,413	0,41	0,434	0,546	0,665	1,805	1,352	1,575
C	0,474	0,357	0,486	1,389	0,426	0,65	0,409	0,395	1,758	0,341	0,969	0,549
D	0,47	0,431	0,965	0,302	0,483	0,99	0,54	0,349	0,553	0,314	0,565	0,557
E	0,972	0,342	0,399	0,339	0,379	0,44	0,86	0,562	1,399	1,112	0,301	0,96
F	0,386	0,417	0,483	0,447	0,52	0,52	0,979	0,587	0,158	0,397	0,695	0,564
G	0,416	0,5	0,445	0,338	0,325	0,782	0,228	0,442	0,438	0,507	0,894	0,928
H	0,309	0,309	0,492	0,161	0,327	0,346	0,864	0,98	0,604	0,686	0,628	1,651

Tablo 3.20 *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun 24 saatlik mikropilakanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,02025	0,0225	0,009996
%0,5	0,0381	0,0365	0,00866
%1	0,024	0,023	0,011314
%1,5	0,02275	0,0205	0,009161
%2	0,046375	0,0475	0,012059
%2,5	0,058	0,0535	0,027355

Tablo 3.21 *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun 48 saatlik mikropolanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,457625	0,4555	0,042908
%0,5	0,624625	0,5205	0,312631
%1	0,54475	0,48	0,190674
%1,5	0,4935	0,5115	0,075872
%2	0,63175	0,501	0,300982
%2,5	0,491875	0,5015	0,068173

Tablo 3.22 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 24 saatlik mikropola okuyucusunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,020	0,029	0,019	0,019	0,020	0,042	0,016	0,013	0,048	0,042	0,034	0,030
B	0,061	0,028	0,013	0,048	0,066	0,047	0,056	0,064	0,013	0,035	0,061	0,038
C	0,031	0,049	0,076	0,068	0,073	0,071	0,088	0,057	0,074	0,038	0,044	0,056
D	0,055	0,016	0,026	0,068	0,073	0,073	0,069	0,077	0,078	0,062	0,047	0,024
E	0,059	0,067	0,067	0,061	0,034	0,063	0,074	0,078	0,06	0,049	0,074	0,041
F	0,051	0,047	0,064	0,073	0,078	0,046	0,046	0,063	0,042	0,04	0,032	0,035
G	0,079	0,071	0,07	0,066	0,082	0,079	0,078	0,068	0,035	0,038	0,036	0,045
H	0,034	0,051	0,059	0,056	0,049	0,067	0,038	0,03	0,028	0,042	0,025	0,033

Tablo 3.23 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 48 saatlik mikropilaka okuyucusunun ölçümleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,354	0,325	0,335	0,518	0,261	0,444	0,979	1,059	0,725	0,597	0,526	0,527
B	0,5	0,717	0,892	1,012	1,23	0,682	0,734	0,814	1,074	0,463	0,845	0,827
C	0,558	0,857	0,705	0,664	0,801	0,678	0,811	0,769	0,555	0,845	0,917	0,736
D	0,524	0,909	0,761	0,646	0,699	0,675	0,673	0,753	0,637	0,737	0,738	0,795
E	0,522	1,109	0,593	0,494	0,821	0,642	0,323	0,716	0,387	0,774	0,575	0,27
F	0,476	1,034	0,617	0,689	0,823	0,788	0,57	0,479	0,928	0,602	0,649	0,571
G	0,88	0,556	0,469	0,53	0,4	0,633	0,488	0,768	0,526	0,63	0,704	0,388
H	0,554	0,703	0,548	0,623	0,579	0,799	0,443	0,531	0,8	0,542	0,39	0,478

Tablo 3.24 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 24 saatlik mikropilakanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,026125	0,0245	0,009094
%0,5	0,04675	0,0475	0,012303
%1	0,0615	0,0625	0,011551
%1,5	0,059125	0,065	0,016173
%2	0,0625	0,062	0,007329
%2,5	0,049875	0,0465	0,009031

Tablo 3.25 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 48 saatlik mikrop lakanın istatistiksel verileri

Glikoz Konsantrasyonu	Aritmetik Ortalama	Ortanca	Standart Sapma
%0	0,50325	0,522	0,127254
%0,5	0,815375	0,8205	0,106661
%1	0,751125	0,7525	0,066007
%1,5	0,71025	0,718	0,042718
%2	0,587875	0,584	0,124029
%2,5	0,663625	0,633	0,096395

Bu çalışmada kullanılan Mikroorganizmalar ın biyofilm saptama testi istatistiksel verilerine göre bütün suşlarda %1,5 glikoz konsantrasyonunda 48 saat inkübasyon süresi en uygun koşul olarak belirlenmiştir.

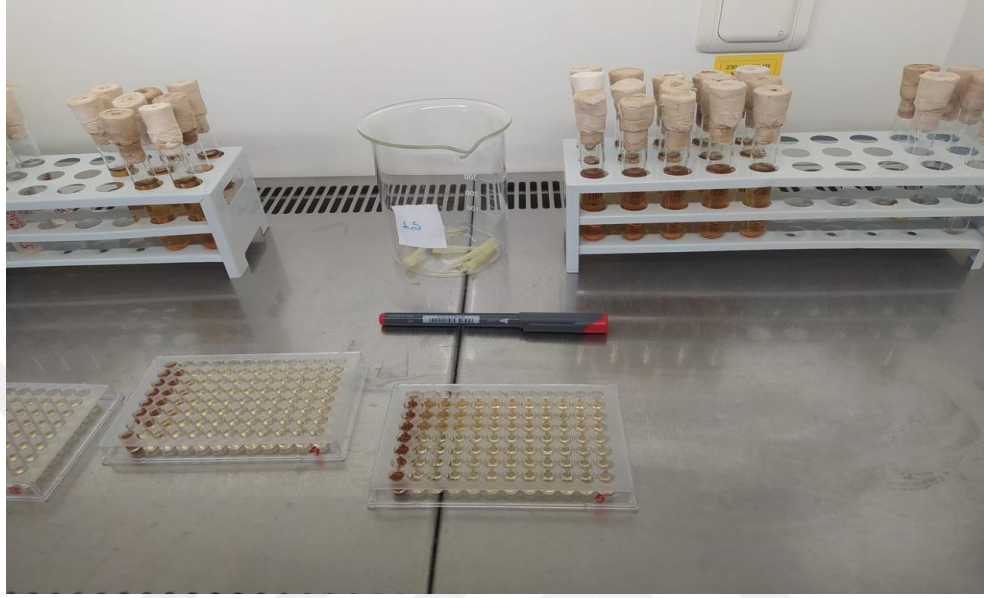
3.11 Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Biyofilm saptama test sonuçlarına göre deneyde kullanılacak bütün suşlar için %1,5 glikoz konsantrasyonuna sahip LB Broth hazırlanmıştır. Deneyde kullanılacak Mikroorganizmalar daha önce steril edilmiş deney tüplerinin içine serum fizyolojik konularak literatür çalışmalarında standart haline gelmiş olan 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanmıştır.

Her bir mikrop lak bir mikroorganizmanın bir bitki ekstraktının antibiyofilm etkisini belirlemesi için yüklenmiştir. Yükleme işlem sırasında her bir mikrop lak kuyucuğuna 100 µL %1,5 glikoz konsantrasyonuna sahip besiyeri konulmuştur. Antibiyofilm aktivitesi belirlenecek olan bitki ekstraktları 1. sütunda bulunan her bir kuyucuğa 100 µL aktarılmıştır. Bu işlem sonrası ekstraktlar 1'den 12'nci sütuna kadar 100 µL transfer edilerek seyreltme işlemi yapılmıştır.

Bitki ekstraktı seyreltme işlemi sonrası her bir kuyucuğa 50 µL 0,5 McFarland yöntemi ile standartı sağlanmış mikroorganizma süspansiyonu konulmuştur. A

satırından F satırına kadar bu şekilde kuyucuklara yükleme işlemi yapılmıştır. G satırına ise 100 μ L besiyeri ve 50 μ L mikroorganizma koyularak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hazırlanmış mikrolaklar 48 saat 37°C’de inkübe edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Bitki ekstraktlarının seyreltme işlemi yapılarak mikrolakalara yüklenmesi

İnkübasyon süresi dolduktan sonra kuyucuklarda oluşan biyofilmi tespit etmek için mikrolakaların içi boşaltılarak, distile su içine 45 derecelik açı yaparak dikkatli bir şekilde mikrolakalar yıkanmıştır. Yıkama işlemin ardından mikrolakalar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan mikrolakaların her bir kuyucuğuna 225 μ L kristal viyole boyası konularak 15 dakika beklenmiştir. Süre sonunda mikrolaka içindeki kristal viyole boşaltılarak distile su ile içine 45 derecelik açı yaparak dikkatli bir şekilde yıkama işlemi yapıp kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan mikrolakaların her bir kuyucuğuna 250 μ L aseton -etil alkol çözeltisi koyularak 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda daha önce mikrolate reader cihazında 550 nm’de boş mikrolakalar ölçümü alınmıştır. Ölçüsü alınan mikrolakalara mikropipet yardımı ile 200 μ L aseton-etil alkol çözeltisi çekilerek mikrolaka paralelde kuyucuklara aktarılmıştır. Aseton-etil alkol çözeltisi aktarılan mikrolakalar mikrolaka okuyucu cihazında 550 nm’de ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 3.26, Tablo 3.27, Tablo 3.28, Tablo 3.29, Tablo 3.30, Tablo 3.31, Tablo 3.32, Tablo 3.33, Tablo 3.34, Tablo 3.35, Tablo 3.36, Tablo 3.37, Tablo 3.38, Tablo 3.39 ve Tablo 3.40’ta verilmiştir.

Tablo 3.26 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Escherichia coli* ATCC 259212 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,069	0,061	0,06	0,06	0,059	0,051	0,04	0,051	0,015	0,038	0,037	0,028
B	0,051	0,057	0,036	0,052	0,062	0,044	0,041	0,039	0,022	0,017	0,031	0,032
C	0,073	0,064	0,062	0,065	0,055	0,03	0,041	0,035	0,026	0,082	0,031	0,023
D	0,09	0,053	0,054	0,073	0,039	0,039	0,038	0,03	0,041	0,025	0,029	0,021
E	0,086	0,062	0,028	0,059	0,07	0,035	0,129	0,044	0,028	0,012	0,024	0,006
F	0,075	0,063	0,064	0,059	0,056	0,05	0,035	0,04	0,037	0,047	0,037	0,044
G	0,049	0,046	0,035	0,066	0,044	0,038	0,036	0,032	0,072	0,112	0,028	0,064
H	0,181	0,042	0,045	0,058	0,041	0,043	0,225	0,047	0,049	0,048	0,037	0,029

Tablo 3.27 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Listeria innocua* bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,193	0,232	0,164	0,19	0,18	0,159	0,067	0,073	0,071	0,071	0,07	0,035
B	0,108	0,148	0,182	0,213	0,144	0,148	0,124	0,084	0,074	0,043	0,072	0,061
C	0,179	0,193	0,218	0,222	0,104	0,17	0,104	0,078	0,092	0,048	0,07	0,081
D	0,371	0,2	0,214	0,138	0,094	0,095	0,079	0,042	0,09	0,049	0,07	0,033
E	0,337	0,283	0,198	0,126	0,14	0,102	0,083	0,084	0,101	0,038	0,029	0,037
F	0,302	0,274	0,18	0,151	0,112	0,085	0,083	0,064	0,107	0,033	0,032	0,031
G	0,137	0,173	0,082	0,114	0,112	0,088	0,104	0,043	0,057	0,043	0,043	0,036
H	1,206	0,222	0,115	0,063	0,07	0,041	0,038	0,057	0,029	0,035	0,052	0,024

Tablo 3.28 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 bakterisinin antibiyofilim etkisinin mikropılaka okuyucu sonuç

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,051	0,019	0,012	0,024	0,031	0,037	0,025	0,023	0,015	0,016	0,084	0,032
B	0,029	0,016	0,013	0,019	0,021	0,023	0,001	0,022	0,018	0,001	0,039	0,022
C	0,039	0,015	0,022	0,017	0,015	0,023	0,026	0,022	0,027	0,031	0,029	0,066
D	0,033	0,024	0,021	0,019	0,004	0,017	0,025	0,01	0,036	0,02	0,019	0,031
E	0,012	0,01	0,026	0,001	0,018	0,054	0,047	0,012	0,015	0,023	0,029	0,03
F	0,025	0,023	0,012	0,023	0,01	0,003	0,009	0,025	0,007	0,019	0,037	0,026
G	0,019	0,017	0,031	0,019	0,029	0,034	0,017	0,027	0,025	0,028	0,028	0,04
H	0,004	0,004	0,018	0,031	0,03	0,017	0,005	0,003	0,011	0,013	0,011	0,25

Tablo 3.29 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 bakterisinin antibiyofilim etkisinin mikropılaka okuyucu sonuç

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,063	0,044	0,03	0,045	0,036	0,037	0,04	0,022	0,02	0,038	0,028
B	0,096	0,038	0,072	0,044	0,108	0,032	0,036	0,04	0,019	0,075	0,053	0,023
C	0,044	0,039	0,052	0,036	0,053	0,072	0,064	0,141	0,032	0,055	0,065	0,034
D	0,027	0,033	0,046	0,043	0,083	0,053	0,057	0,035	0,017	0,104	0,027	0,058
E	0,037	0,045	0,038	0,03	0,059	0,073	0,045	0,021	0,024	0,03	0,034	0,041
F	0,039	0,069	0,075	0,036	0,03	0,033	0,051	0,068	0,031	0,024	0,024	0,027
G	0,042	0,045	0,049	0,034	0,042	0,02	0,052	0,058	0,021	0,031	0,025	0,051
H	0,287	0,05	0,026	0,028	0,028	0,043	0,036	0,042	0,03	0,039	0,026	0,022

Tablo 3.30 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Escherichia coli* 1214816 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikropılaka okuyucu reader sonuç

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,05	0,036	0,019	0,017	0,019	0,026	0,024	0,022	0,02	0,025	0,023	0,027
B	0,136	0,017	0,022	0,014	0,014	0,017	0,024	0,023	0,025	0,022	0,017	0,038
C	0,048	0,02	0,024	0,031	0,023	0,023	0,021	0,017	0,019	0,026	0,031	0,024
D	0,054	0,063	0,028	0,025	0,025	0,022	0,026	0,019	0,025	0,023	0,027	0,023
E	0,171	0,046	0,045	0,026	0,026	0,014	0,014	0,014	0,022	0,026	0,026	0,028
F	0,203	0,026	0,027	0,033	0,025	0	0,022	0,007	0,03	0,025	0,026	0,013
G	0,242	0,022	0,018	0,019	0,016	0,017	0,021	0,027	0,034	0,022	0,024	0,02
H	0,404	0,028	0,005	0,04	0,083	0,012	0,036	0,017	0,01	0,025	0,015	0,027

Tablo 3.31 *Achillea fraasii* bitkisinin *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikropılaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,108	0,091	0,084	0,149	0,244	0,193	0,324	0,147	0,109	0,171	0,071	0,061
B	0,147	0,133	0,112	0,22	0,258	0,135	0,218	0,133	0,063	0,162	0,084	0,053
C	0,148	0,131	0,179	0,23	0,518	0,325	0,183	0,071	0,109	0,149	0,066	0,076
D	0,06	0,187	0,145	0,211	0,433	0,662	0,524	0,151	0,123	0,105	0,043	0,053
E	0,335	0,44	0,795	0,279	0,189	0,262	0,389	0,18	0,284	0,043	0,085	0,048
F	0,151	0,356	0,241	0,318	0,254	0,141	0,624	0,49	0,194	0,089	0,071	0,043
G	0,075	0,114	0,26	0,134	0,063	0,387	0,292	0,272	0,306	0,086	0,034	0,043
H	0,19	0,346	0,228	0,161	0,528	0,162	0,148	0,178	1,42	0,076	0,048	0,056

Tablo 3.32 *Achillea fraasii* bitkisinin *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,124	0,136	0,233	0,36	0,575	0,175	0,065	0,06	0,069	0,151	0,217	0,119
B	0,137	0,138	0,229	0,406	0,137	0,204	0,287	0,092	0,141	0,103	0,074	0,074
C	0,219	0,203	1,537	0,656	0,195	0,194	0,079	0,324	0,15	0,227	0,076	0,171
D	0,199	0,101	0,222	0,217	0,326	0,161	0,091	0,107	0,167	0,138	0,082	0,098
E	0,099	0,115	0,271	0,055	0,182	0,083	0,484	0,098	0,101	0,093	0,084	0,133
F	0,185	0,176	0,258	0,139	0,201	0,274	0,331	0,233	0,471	0,168	0,078	0,078
G	0,071	0,147	0,14	0,353	0,236	0,365	0,298	0,394	0,153	0,132	0,117	0,248
H	0,164	0,167	0,213	0,261	0,098	0,192	0,122	0,171	0,152	0,09	0,177	0,204

Tablo 3.33 *Achillea fraasii* bitkisinin *Listeria innocua* bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,545	0,931	0,717	0,573	0,485	0,487	0,741	3,19	0,554	0,384	0,171	0,064
B	1,088	1,527	0,818	0,606	0,701	3,402	3,872	1,281	0,631	0,599	0,318	0,222
C	2,66	1,268	2,824	0,353	2,117	3,69	1,67	2,092	3,898	0,628	0,187	0,15
D	2,091	2,054	1,584	0,29	1,173	1,966	1,931	2,739	0,981	0,633	0,335	0,254
E	3,54	1,614	1,094	0,716	1,172	3,757	1,493	3,865	3,906	0,641	0,29	3,677
F	2,877	0,746	0,612	0,587	0,988	1,663	3,932	3,709	3,875	0,339	0,462	2,103
G	0,204	1,092	1,41	3,715	3,772	1,376	2,201	3,915	1,023	0,89	0,347	0,31
H	0,935	1,626	3,023	1,218	0,466	0,77	0,598	2,568	0,428	2,548	0,188	0,224

Tablo 3.34 *Achillea fraasii* bitkisinin *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikropilaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,018	0,804	0,277	0,243	0,176	0,184	0,187	0,158	0,125	0,149	0,078	0,114
B	0,549	0,547	0,18	0,219	0,174	0,26	0,657	0,328	0,214	0,182	0,502	0,044
C	0,837	1,08	0,425	0,169	0,186	0,815	0,721	0,454	1,833	0,941	0,198	0,062
D	0,344	0,739	0,418	0,194	0,224	0,308	0,328	0,741	0,21	0,73	0,243	0,221
E	1,194	0,474	0,4	0,162	0,301	0,672	0,19	0,248	0,24	0,532	0,138	0,094
F	0,788	0,668	0,471	0,204	0,21	0,202	0,89	0,263	0,323	0,215	0,187	0,315
G	0,483	0,513	0,402	0,147	0,231	0,132	0,16	0,265	0,334	0,21	0,098	0,133
H	3,311	1,016	0,938	0,187	0,263	0,245	0,207	0,214	0,209	0,06	0,085	0,064

Tablo 3.35 *Achillea fraasii* bitkisinin *Escherichia coli* 1214816 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikropilaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,606	0,628	0,49	0,296	0,321	0,364	0,154	0,235	0,336	0,215	0,145	0,14
B	0,821	1,153	0,415	0,214	0,326	0,79	0,208	0,117	0,187	0,184	0,219	0,152
C	0,778	1,111	0,632	3,804	0,842	0,207	0,314	0,105	0,187	0,247	0,262	0,094
D	1,33	0,63	1,527	0,719	0,515	0,377	3,762	3,817	0,316	0,149	0,178	0,214
E	0,763	0,646	0,453	0,655	0,353	0,53	0,815	0,78	0,315	0,181	0,261	0,078
F	0,391	0,418	0,315	0,249	0,388	0,595	0,56	3,873	0,72	0,231	0,272	0,202
G	0,154	0,483	0,263	0,263	0,342	0,266	0,464	3,767	3,89	0,161	0,194	0,115
H	1,984	1,703	0,498	0,721	0,473	0,271	0,441	0,557	0,818	0,16	0,283	0,29

Tablo 3.36 *Sideritis trojana* bitkisinin *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,073	0,039	0,032	0,043	0,055	0,051	0,049	0,069	0,062	0,063	0,047	0,03
B	0,336	0,249	0,044	0,181	0,024	0,039	0,056	0,044	0,044	0,043	0,039	0,033
C	0,063	0,067	0,05	0,036	0,116	0,052	0,039	0,052	0,048	0,035	0,03	0,044
D	0,053	0,146	0,044	0,043	0,055	0,043	0,035	0,074	0,026	0,039	0,062	0,036
E	0,053	0,037	0,064	0,074	0,052	0,053	0,045	0,056	0,038	0,032	0,031	0,031
F	0,075	0,041	0,074	0,075	0,058	0,258	0,049	0,037	0,118	0,051	0,036	0,03
G	0,047	0,038	0,032	0,057	0,089	0,059	0,041	0,044	0,044	0,04	0,049	0,033
H	0,031	0,056	0,038	0,049	0,07	0,047	0,036	0,041	0,047	0,035	0,028	0,028

Tablo 3.37 *Sideritis trojana* bitkisinin *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,036	0,054	0,05	0,088	0,076	0,051	0,051	0,042	0,041	0,039	0,034	0,034
B	0,056	0,08	0,07	0,079	0,083	0,164	0,119	0,088	0,082	0,035	0,046	0,037
C	0,047	0,082	0,105	0,064	0,103	0,07	0,059	0,06	0,198	0,117	0,036	0,027
D	0,044	0,061	0,053	0,091	0,141	0,073	0,192	0,129	0,167	0,056	0,06	0,029
E	0,047	0,05	0,19	0,133	0,137	0,14	0,079	0,054	0,118	0,162	0,072	0,044
F	0,063	0,086	0,068	0,133	0,142	0,23	0,13	0,125	0,071	0,077	0,204	0,051
G	0,065	0,1	0,053	0,056	0,201	0,159	0,125	0,085	0,073	0,047	0,099	0,041
H	0,292	0,066	0,474	0,484	0,096	0,255	0,108	0,064	0,081	0,064	0,053	0,043

Tablo 3.38 *Sideritis trojana* bitkisinin *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,069	0,097	0,075	0,111	0,109	0,119	0,099	0,143	0,114	0,11	0,121	0,094
B	0,139	0,097	0,1	0,086	0,073	0,102	0,151	0,089	0,044	0,12	0,096	0,064
C	0,439	0,096	0,118	0,12	0,116	0,094	0,153	0,142	0,088	0,164	0,088	0,05
D	0,075	0,078	0,142	0,218	0,097	0,088	0,076	0,07	0,078	0,075	0,091	0,028
E	0,17	0,103	0,185	0,269	0,169	0,221	0,128	0,101	0,054	0,078	0,067	0,085
F	0,106	0,116	0,093	0,003	0,103	0,199	0,099	0,104	0,09	0,091	0,045	0,044
G	0,145	0,07	0,15	0,226	0,266	0,124	0,081	0,062	0,128	0,053	0,079	0,046
H	0,199	0,112	0,726	0,804	0,153	0,117	0,149	0,104	0,108	0,083	0,065	0,031

Tablo 3.39 *Sideritis trojana* bitkisinin *Listeria innocua* bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikrolaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,059	0,049	0,054	0,068	0,089	0,089	0,136	0,097	0,083	0,062	0,067	0,051
B	0,12	0,077	0,024	0,055	0,077	0,059	0,087	0,067	0,054	0,078	0,098	0,072
C	0,069	0,082	0,089	0,113	0,283	0,13	0,039	0,113	0,111	0,083	0,081	0,1
D	0,065	0,103	0,189	0,11	0,068	0,123	0,177	0,143	0,078	0,094	0,095	0,09
E	0,068	0,097	0,115	0,135	0,058	0,151	0,691	0,116	0,155	0,118	0,075	0,086
F	0,076	0,058	0,142	0,089	0,224	0,075	0,075	0,081	0,154	0,075	0,103	0,071
G	0,056	0,084	0,077	0,054	0,088	0,147	0,182	0,076	0,068	0,068	0,084	0,076
H	0,24	0,217	0,197	0,263	0,132	0,155	0,171	0,1	0,132	0,139	0,083	0,057

Tablo 3.40 *Sideritis trojana* bitkisinin *Escherichia coli* 1214816 bakterisinin antibiyofilm etkisinin mikroplaka okuyucu sonucu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,109	0,097	0,217	0,294	0,202	0,224	0,309	0,349	0,189	0,233	0,174	0,114
B	0,068	0,05	0,073	0,076	0,086	0,12	0,145	0,195	0,134	0,155	0,147	0,137
C	0,049	0,07	0,049	0,086	0,224	0,14	0,129	0,117	0,095	0,091	0,102	0,046
D	0,062	0,057	0,12	0,073	0,112	0,114	0,123	0,154	0,108	0,113	0,078	0,044
E	0,051	0,042	0,074	0,064	0,088	0,111	0,1	0,091	0,108	0,082	0,067	0,05
F	0,062	0,075	0,056	0,09	0,072	0,102	0,075	0,081	0,084	0,099	0,059	0,054
G	0,039	0,054	0,143	0,057	0,084	0,126	0,138	0,13	0,096	0,077	0,063	0,038
H	0,074	0,417	0,231	0,182	0,059	0,067	0,079	0,063	0,078	0,047	0,055	0,049

BÖLÜM DÖRT

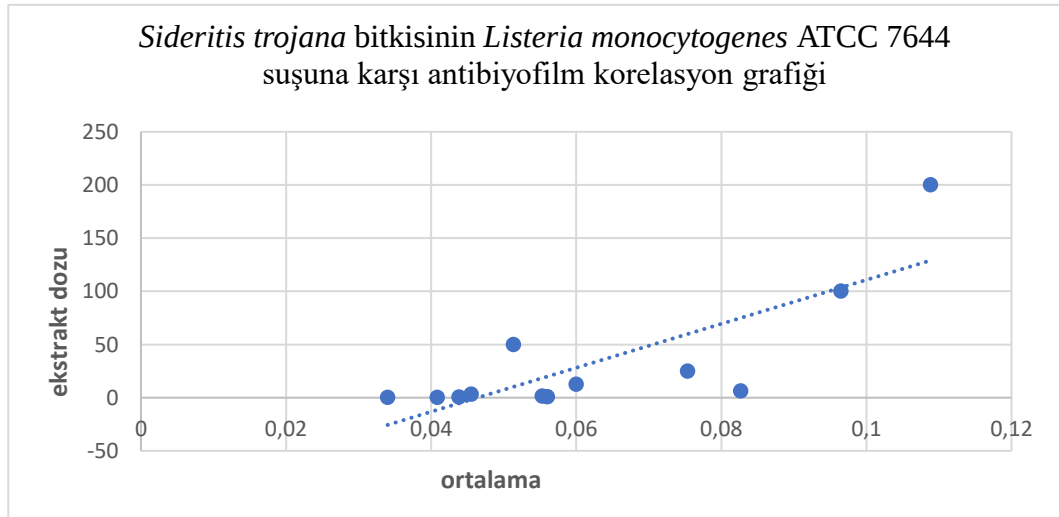
BULGULAR

Bu deney çalışmasında 3 endemik bitkinin antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi için 6 paralel ile çalışılmıştır. Sonuçların standart sapma, ortalama değerleri hesaplanmıştır. Bitki ekstraktlarının toz miktarı ile antibiyofilm etkisinin arasındaki ilişkiyi anlamlandırmak için korelasyon değerleri bulunmuştur.

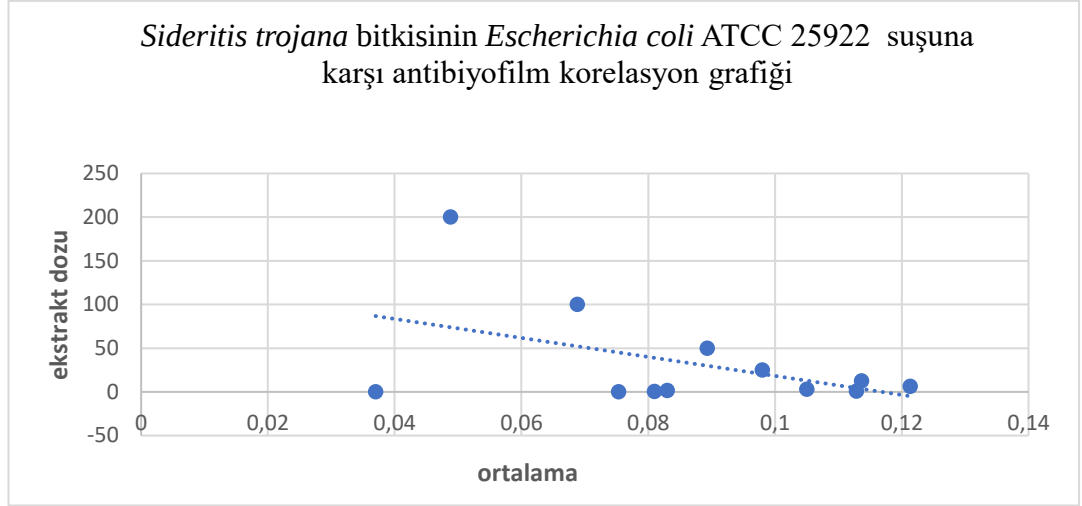
4.1 *Sideritis trojana* Bitkisinin Antibiyofilm Sonuçları

Sideritis trojana bitkisinin farklı dozdaki ekstraktlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı güçlü pozitif, *Escherichia coli* 1214329 suşuna karşı ise güçlü negatif etki gösterdiği belirlenmiştir. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı orta derecede negatif, *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 orta pozitif etki göstermiştir. *Listeria innocua* suşuna karşı *Sideritis trojana* bitki ekstraktlarının etki göstermediği tespit edilmiştir.

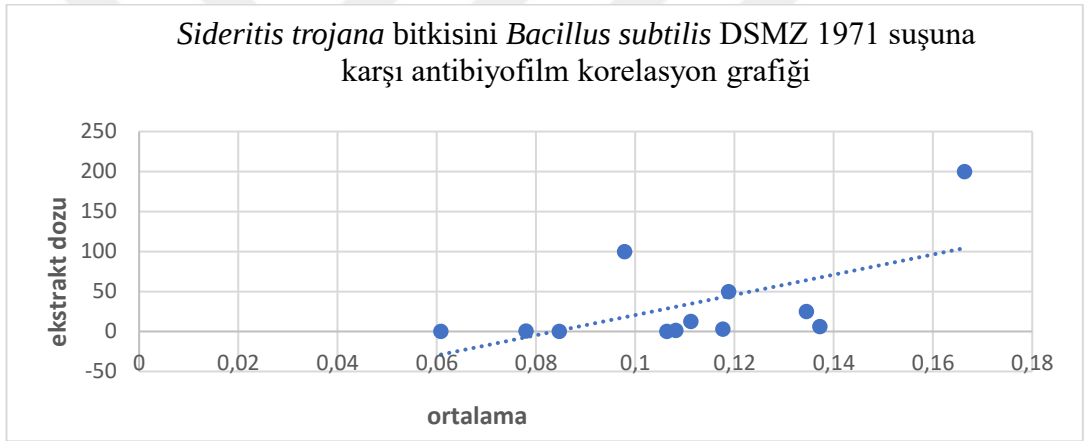
Sideritis trojana bitkisinin farklı dozdaki ekstraktlarının deneyde kullanılan Mikroorganizmalar a gösterdiği antibiyofilm etkisi Grafik 4.1, Grafik 4.2, Grafik 4.3, Grafik 4.4 ve Grafik 4.5'te gösterilmiştir.



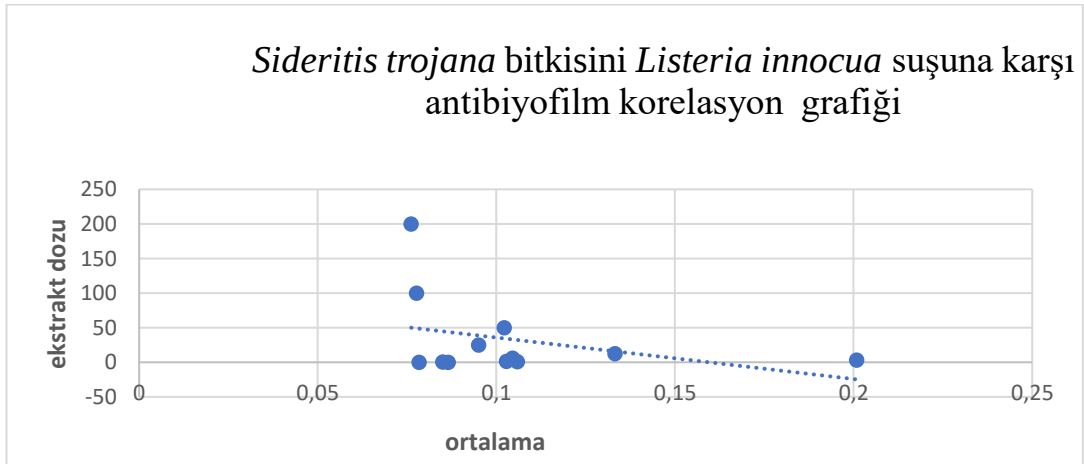
Şekil 4.1 *Sideritis trojana* bitkisinin *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı antibiyofilm etkisinin korelasyon grafiği



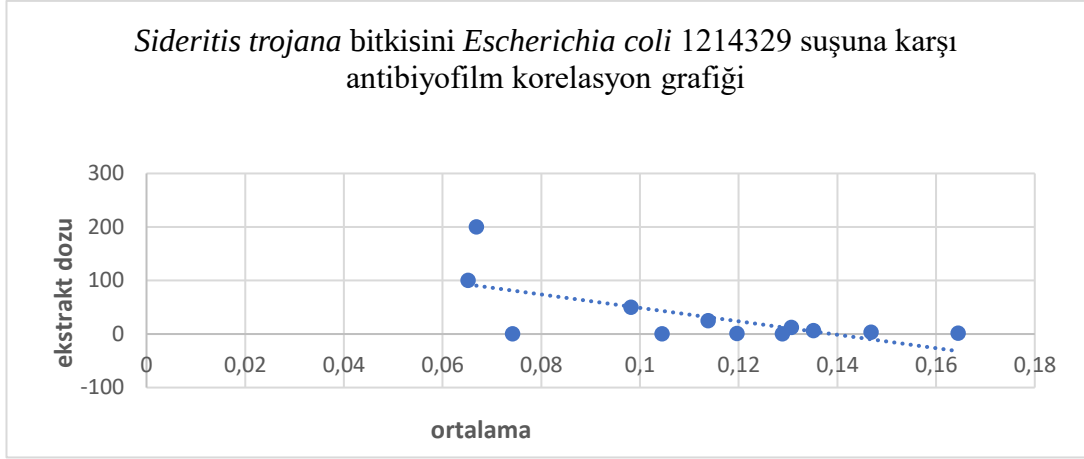
Şekil 4.2 *Sideritis trojana* bitkisinin *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği



Şekil 4.3 *Sideritis trojana* bitkisini *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği



Şekil 4.4 *Sideritis trojana* bitkisini *Listeria innocua* suşuna karşı antibiyofilm etkisinin korelasyon grafiği



Şekil 4.5 *Sideritis trojana* bitkisini *Escherichia coli* 1214329 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği

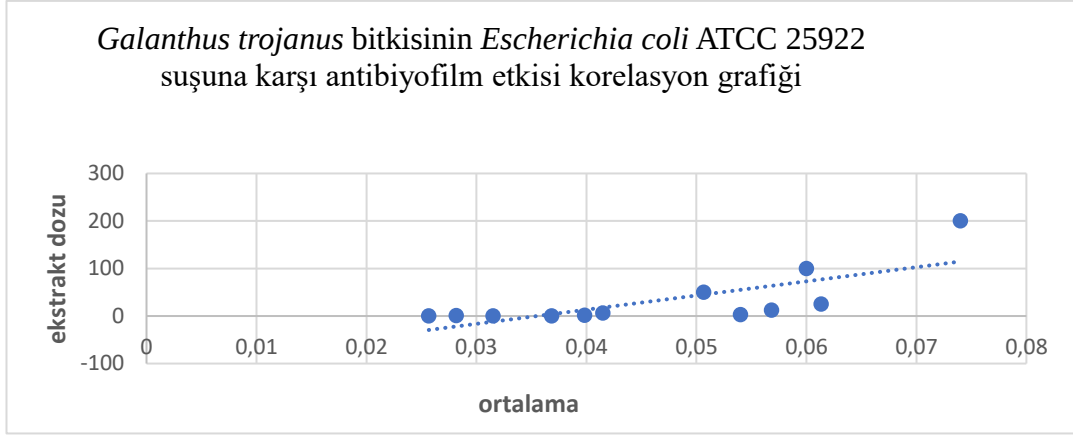
Tablo 4.1 *Sideritis trojana* bitkisinin antibiyofilm Pearson korelasyon katsayıları

Mikroorganizma Adı	Korelasyon Değeri
<i>Escherichia coli</i> 1214329	-0,66085
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-0,46965
<i>Listeria innocua</i>	-0,34317
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,801392
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	0,594855

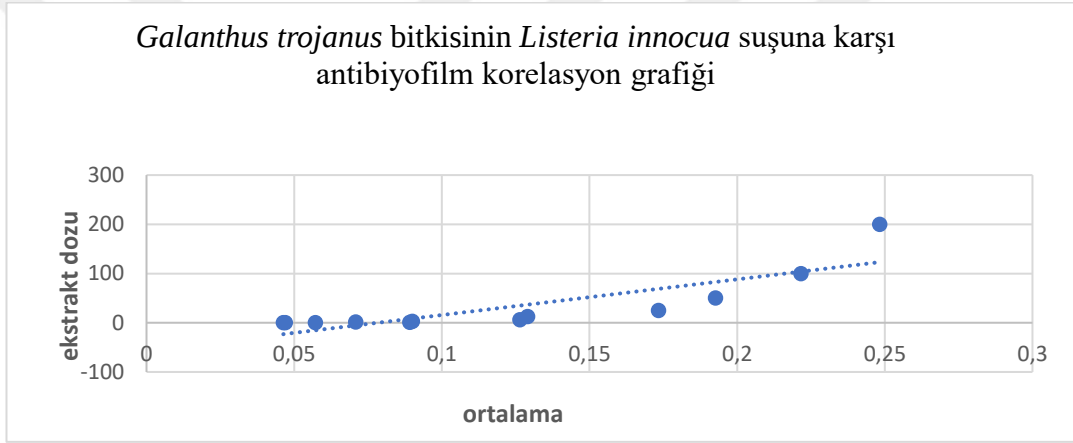
4.2 *Galanthus trojanus* Bitkisinin Antibiyofilm Sonuçları

Galanthus trojanus bitkisinin farklı dozdaki ekstraktlarının *Listeria innocua*, *Escherichia coli* 1214329, *Escherichia coli* ATCC 25922 suşlarına karşı güçlü yönde pozitif etki gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus subtilis* DSMZ 1971, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşlarına karşı bitki ekstrakt dozlarının zayıf yönde pozitif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

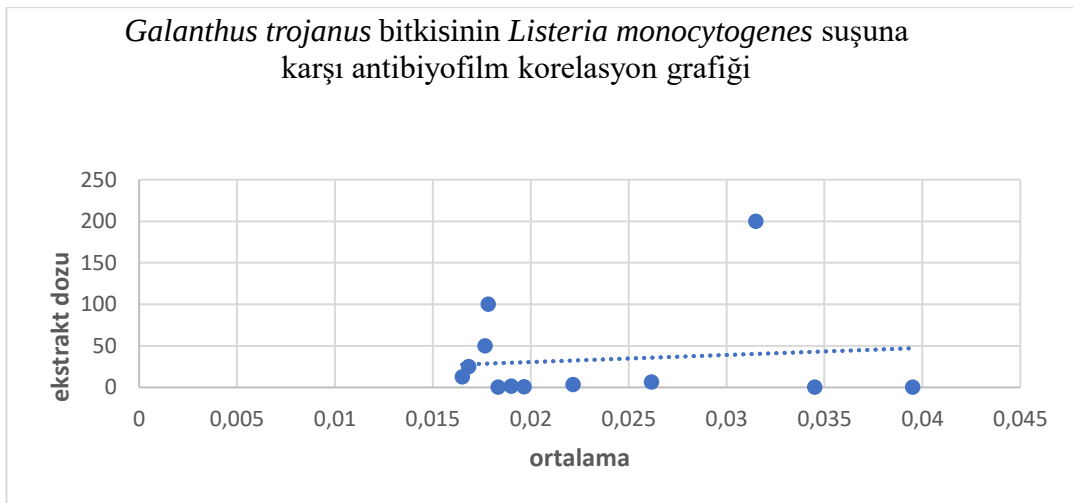
Galanthus trojanus bitkisinin farklı dozdaki ekstraktlarının deneyde kullanılan Mikroorganizmalar a gösterdiği antibiyofilm etkisi Grafik 4.6, Grafik 4.7, Grafik 4.8, Grafik 4.9 ve Grafik 4.10'da gösterilmiştir. Korelasyon değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.



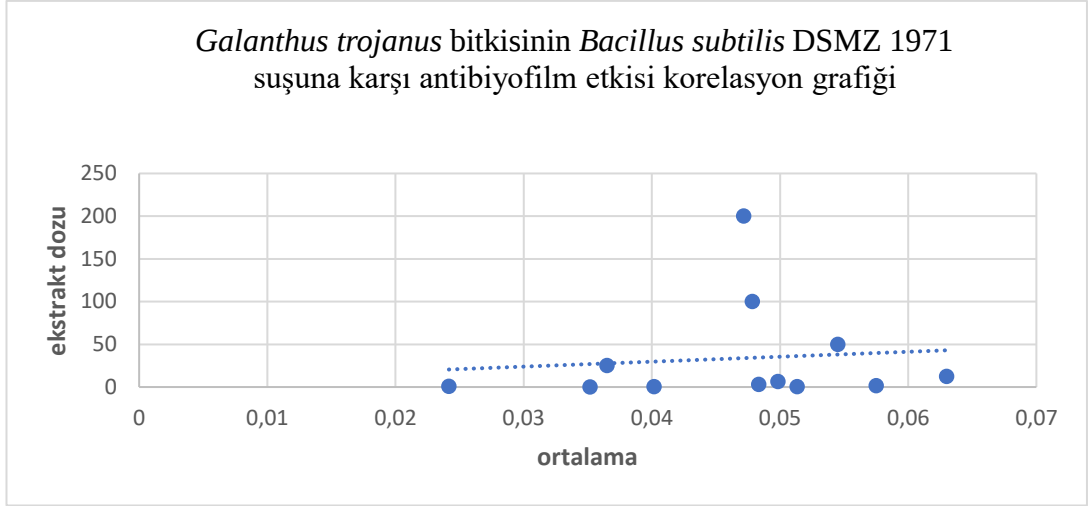
Şekil 4.6 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı antibiyofilm etkisi korelasyon grafiği



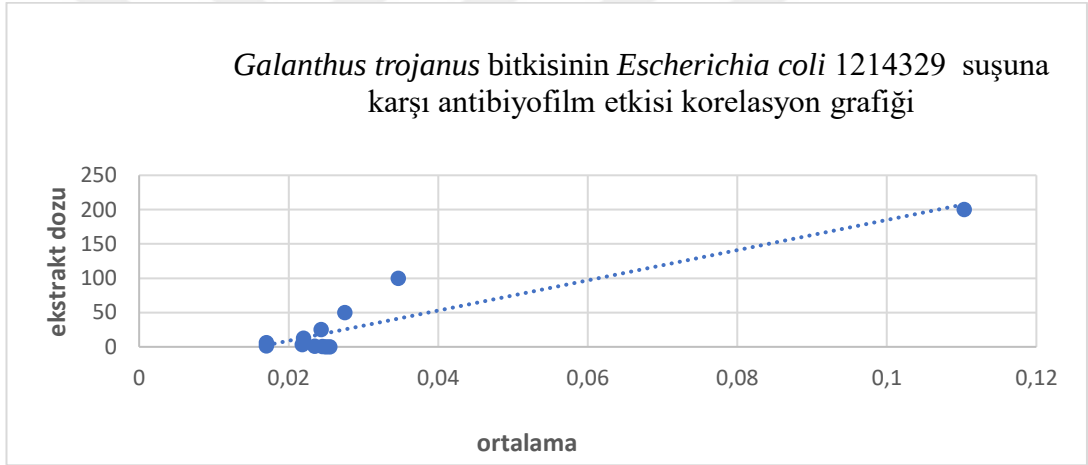
Şekil 4.7 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Listeria innocua* suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği



Şekil 4.8 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Listeria monocytogenes* suşuna karşı antibiyofilm etkisi korelasyon grafiği



Şekil 4.9 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşuna karşı antibiyofilm etkisi korelasyon grafiği



Şekil 4.10 *Galanthus trojanus* bitkisinin *Escherichia coli* 1214329 suşuna karşı antibiyofilm etkisi korelasyon grafiği

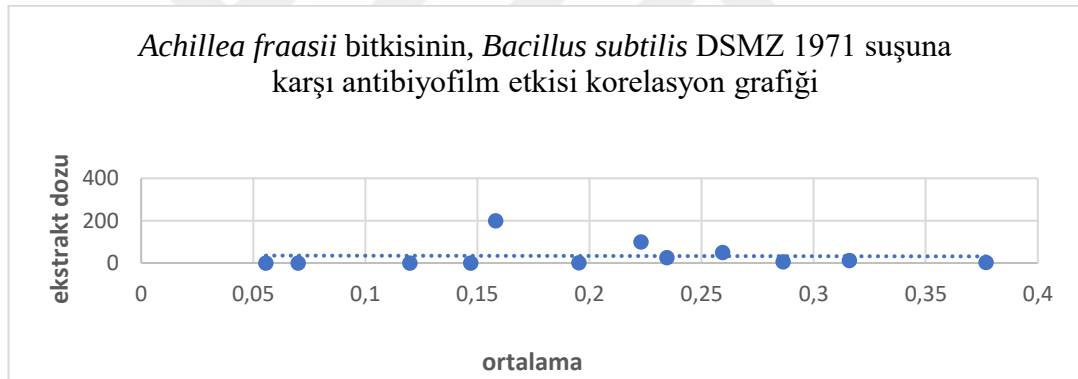
Tablo 4.2 *Galanthus trojanus* bitkisinin antibiyofilm Pearson korelasyon katsayıları

Mikroorganizma Adı	Korelasyon Değeri
<i>Escherichia coli</i> 1214329	0,926085
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,74444
<i>Listeria innocua</i>	0,840188
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,110074
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	0,102938

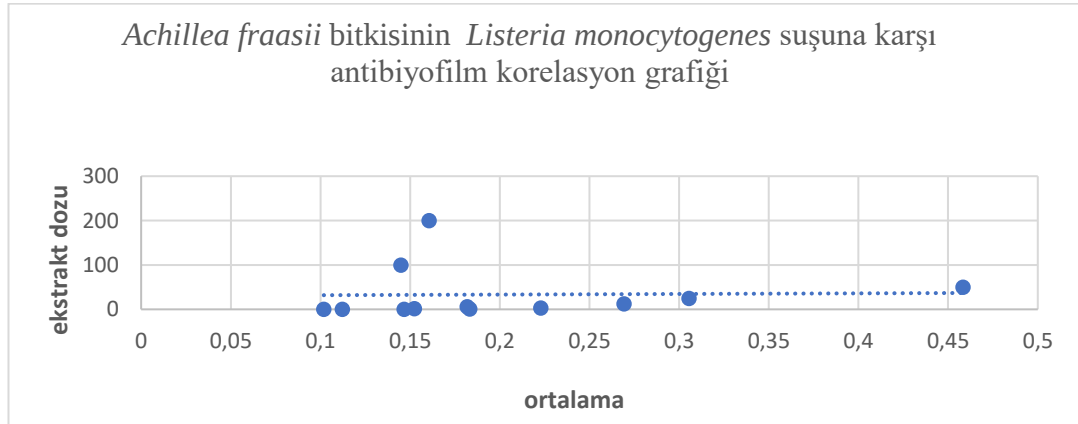
4.3 *Achillea fraasii* Bitkisinin Antibiyofilm Sonuçları

Achillea fraasii bitkisinin farklı dozdaki Ekstraktlarının *Escherichia coli* ATCC 25922 suşlarına karşı güçlü yönde pozitif etki gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşuna karşı *Achillea fraasii* bitkisi ekstraktlarının etki göstermediği tespit edilmiştir. *Escherichia coli* 1214329 ve *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* suşlarına karşı zayıf derecede pozitif yönde antibiyofilm etkisi göstermiştir.

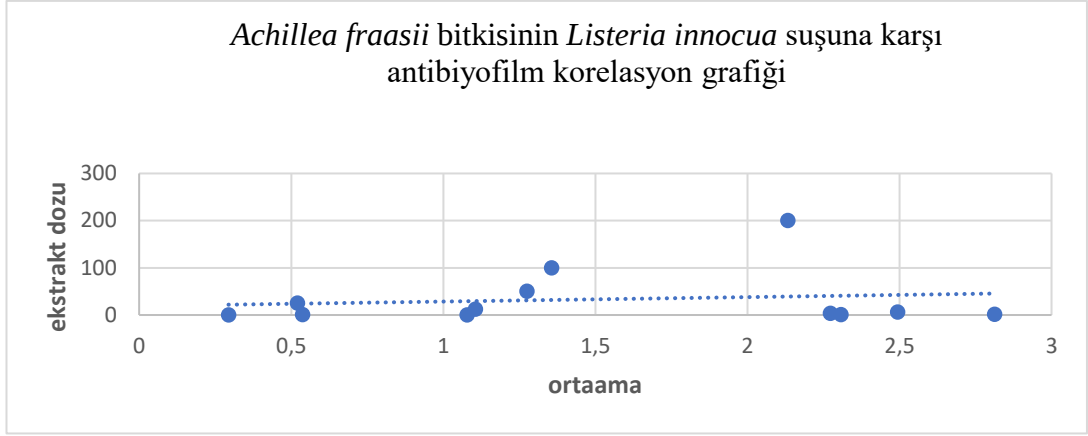
Achillea fraasii bitkisinin farklı dozdaki ekstraktlarının deneyde kullanılan Mikroorganizmalar a gösterdiği antibiyofilm etkisi Grafik 4.11, Grafik 4.12, Grafik 4.13, Grafik 4.14 ve Grafik 4.15'te gösterilmiştir. Korelasyon değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.



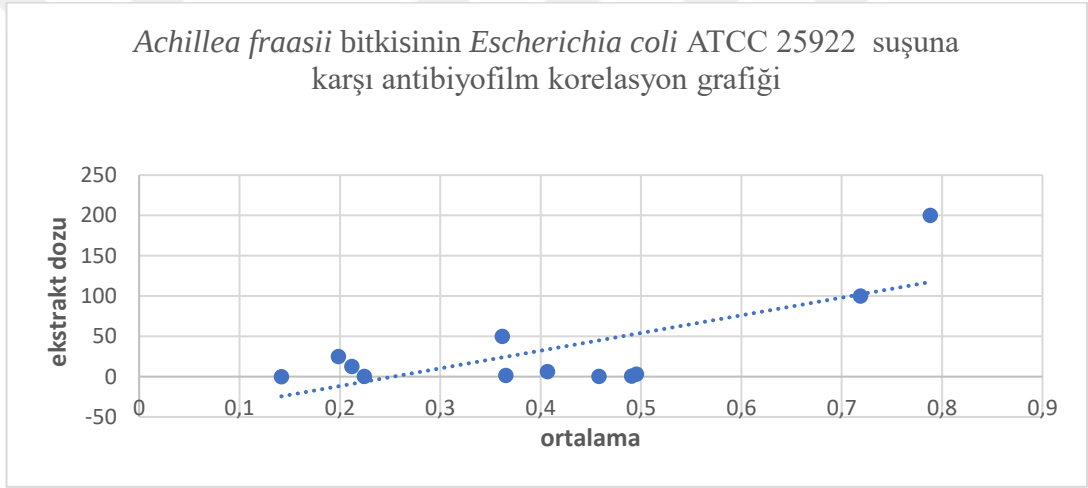
Şekil 4.11 *Achillea fraasii* bitkisinin *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği



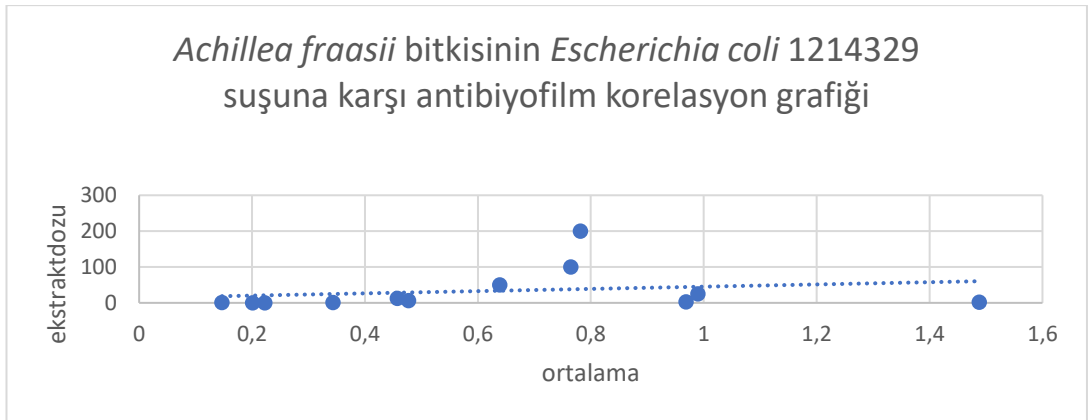
Şekil 4.12 *Achillea fraasii* bitkisinin *Listeria monocytogenes* suşuna karşı antibiyofilm etkisi korelasyon grafiği



Şekil 4.13 *Achillea fraasii* bitkisinin *Listeria innocua* suşuna karşı antibiyofilm etkisi korelasyon grafiği



Şekil 4.14 *Achillea fraasii* bitkisinin *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği



Şekil 4.15 *Achillea fraasii* bitkisinin *Escherichia coli* 1214329 suşuna karşı antibiyofilm korelasyon grafiği

Tablo 4.3 *Achillea fraasii* bitkisinin antibiyofilm Pearson korelasyon katsayıları

Mikroorganizma Adı	Korelasyon Değeri
<i>Escherichia coli</i> 1214329	0,205187
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,734771
<i>Listeria innocua</i>	0,133411
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,022824
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	0,01867

BÖLÜM BEŞ

TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun biyofilmine *Achillea fraasii* ve *Galanthus trojanus* bitkilerinden elde edilen ekstraktların pozitif korelasyonla güçlü etki gösterdiği tespit edilmiştir. *Sideritis trojana* bitkisi ise *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna orta derecede negatif korelasyonla antibiyofilm etkisi göstermiştir.

Gürbüz (2019) yaptığı çalışmada *Arbutus andrachne* bitkisinden elde ettikleri uçucu yağın antibiyofilm etkisi *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunda 100 µg/ml doz, *Jasminum nudiflorum* bitkisinin 50 µg/ul konsantrasyonundaki ekstraktından sonra etki göstermediği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun biyofilmine *Achillea fraasii* ve *Galanthus trojanus* bitkilerinden elde edilen ekstraktların yüksek etki ettiği görülmüştür. Bu farkın kullanılan bitki ekstraktlarının kimyasal bileşenlerinin olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada *Listeria monocytogenes* suşunun biyofilmine karşı *Galanthus trojanus* ve *Achillea fraasii* bitkilerinden elde edilen ekstraktlara karşı pozitif yönde zayıf etki etmiştir. *Sideritis trojana* bitkisinin antibiyofilm etkisinin *Listeria monocytogenes* suşuna karşı pozitif yönde yüksek etki ettiği tespit edilmiştir.

Chorianopoulos vd. (2008), yaptığı çalışmada *Satureja thymbra* yağların *Listeria monocytogenes* suşunun biyofilmine etki ettiğini tespit etmiştir. Gao vd. (2020), ağaç kabuklarından elde ettiği uçucu yağlar *Listeria monocytogenes* suşuna karşı yüksek antibiyofilm etkisi göstermiştir. Baumann vd. (2009), yaptıkları çalışmada ultrason ve ozonlama tekniği ile *Listeria monocytogenes* suşunun biyofilmine etki etmişlerdir. Ancak yapılan işlem paslanmaz çelik üzerinde oluşan biyofilm tabakasına etki etmiştir.

Yaptığımız çalışmada *Listeria innocua* suşunun biyofilm tabakasına *Galanthus trojanus* bitkisinden elde edilen ekstraktın çok güçlü pozitif yönde etki ettiği görülmüştür. *Achillea fraasii* bitkisinin antibiyofilm etkisi zayıf etki gösterirken *Sideritis trojana* bitkisinin ekstraktı *Listeria innocua* suşunun biyofilmine hiç etki

göstermemiştir. Koç ve Erginkaya (2020) tarafından yapılan probiyotik *Bacillus coagulans*'ın *Listeria innocua* suşunun biyofilmine karşı etki etmediği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda *Galanthus trojanus* bitkisinden elde edilen ekstraktın yüksek etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşunun biyofilmine karşı *Galanthus trojanus* ve *Sideritis trojana* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar pozitif yönde zayıf etki etmiştir. *Achillea fraasii* bitkisinin antibiyofilm etkisi *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşuna karşı etki etmediği tespit edilmiştir. Ülgen (2019), ketencik tohum yağı ekstraktlarının antibiyofilm çalışmasını yapmıştır. Yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* suşuna karşı hazırladığı bitki ekstraktlarının antibiyofilm aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Tozyılmaz ve arkadaşları (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Alyssum caricum*, *Alyssum discolor* ve *Alyssum sibiricum* bitkilerinin ekstraktları *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 mikroorganizmasına antibiyofilm etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda *Galanthus trojanus* ve *Sideritis trojana* bitkilerinin ekstraktlarının antibiyofilm etkisi tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada *Escherichia coli* 1214329 suşunun biyofilm tabakasına *Galanthus trojanus* bitkisinden elde edilen ekstrakt çok güçlü pozitif yönde, *Sideritis trojana* bitki ekstraktı ise negatif yönde güçlü etki göstermiştir. *Achillea fraasii* bitkisinin antibiyofilm etkisi *Escherichia coli* 1214329 suşuna karşı pozitif yönde zayıf etki gösterdiği tespit edilmiştir. Literatür taramasında *Escherichia coli* 1214329 suşu ile ilgili antibiyofilm çalışması yapılmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *Galanthus trojanus*, *Sideritis trojana* ve *Achillea fraasii* endemik bitkilerinden elde edilen su bazlı ekstraktların antibiyofilm etkileri karşılaştırıldığında *Sideritis trojana* bitkisinin çalışılan 5 mikroorganizmanın biyofilmine güçlü etki ettiği tespit edilmiştir. *Galanthus trojanus* bitkisi çalışılan suşların biyofilmine güçlü ve orta derecede etki etmiştir. *Achillea fraasii* bitki ekstraktı ise çalışılan Mikroorganizmalar karşı diğer ekstraktlara oranla daha zayıf antibiyofilm etki göstermiştir.

BÖLÜM ALTI

SONUÇ

Dünya üzerindeki nüfus artışı ve salgın hastalıkların canlı popülasyonu üzerindeki etkisi gün geçtikçe ciddi problemler oluşturmaktadır. İlaç sektöründe üretilen sentetik ilaçların biyofilm tabakası oluşturan Mikroorganizmalar a karşı etkisinin yeterli olmaması ve biyofilm tabakasının hem sağlık hem de endüstriyel alanda sorun teşkil etmesi sebebiyle toksin etkisi az olan doğal ilaç ve madde analizine yönelmeyi arttırmıştır.

Bu tez çalışmasına başlamadan önce yapılan literatür araştırmasında 3 endemik bitki ile ilgili antibiyofilm çalışması olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Galanthus trojanus*, *Sideritis trojana* ve *Achillea fraasii* endemik bitkilerden elde edilen su bazlı ekstraktların antibiyofilm etkileri araştırıldı. Çalışmada elde edilen sonuçları benzer çalışmaların sonuçları ve bitki ekstraktlarının sonuçları ile kendi aralarında karşılaştırarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında *Achillea fraasii* bitkisinden elde edilen ekstraktın *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun biyofilm tabakası oluşturmada aktivatör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *Sideritis trojana* bitkisinden elde edilen ekstraktı *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 suşlarına karşı yüksek biyofilm etkisi göstermiştir. Bitki ekstraktının dozu arttıkça mikroorganizmaların biyofilm oluşturma miktarı arttığı görülmüştür. Buda gıda sanayisi için besin olarak kullanılma yolunda bir ışıktır. Ayrıca *Sideritis trojana* bitkisinin ekstraktları *Escherichia coli* ve *Listeria innocua* suşlarında antibiyofilm etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

Galanthus trojanus bitki ekstraktı da *Escherichia coli* 1214329, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* ATCC 25922 suşlarına karşı yüksek biyofilm etkisi gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmada bitki ekstraktlarının dozu arttıkça suşların biyofilm oluşturmalarını tetiklediği tespit edilmiştir. Gıda sanayisi için bitki ekstraktının kullanılması ve yeni bir besin kaynağı olan biyofilm aktivitesi olarak araştırılması yolunda ilk adımdır.

Elde ettiğimiz veriler ışığında bitki ekstraktları kullandığımız 5 mikroorganizma dışında farklı suşların biyofilm tabakalarında denenerek antibiyofilm etkisi tespit edilebilir. Ayrıca sonuçlarımız doğrultusunda elde ettiğimiz su bazlı bitki ekstraktlarının bileşenleri teker teker denenerek hangi bileşenin antibiyofilm etkisi olduğu araştırılmalıdır. Bu çalışmada antibiyofilm etkisi gösteren bitki ekstraktlarının elde edilmesi mümkün olmuştur. Bu sonuçların ilaç ve endüstriyel alanda kullanılması için daha fazla veri elde etmemiz gerekmektedir. Bu tez çalışmasındaki sonuçlar yapılacak olan çalışmalar için öncül niteliğindedir.

Biyofilm, biyofilm tabakası oluşturan Mikroorganizmalar ın antibiyotiklere direnç kazanmasına, bakteriyel enfeksiyon tedavilerinin zorlaşmasına ve sanayi alanında maddi kayıp yaşanmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı bu tür araştırmalar biyofilmin neden olduğu dezavantajları azaltmada etkili olabilir. Ayrıca küreselleşen dünyada gıda sorununa çözüm olarak görülen biyofilm oluşumunu tetikleyen madde bulunmasında da bu tür çalışmalar öncül niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Arabacı, T. (2006). *Türkiye'de yetişen achillea L. (Asteraceae) cinsinin revizyonu* [Doktora Tezi]. İnönü Üniversitesi.
- Arar, D. (2015). *Bakteriyal biyofilm oluşumu* [Yüksek Lisans Tezi]. Pamukkale Üniversitesi.
- Akyüz, A. (2019). *Bazı Mikroorganizmalar ın biyofilm oluşturma yeteneği üzerine dezenfektanların etkisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Namık Kemal Üniversitesi.
- Altınok, Ö. (2018). *Çok İlaça Dirençli İnvaziv Acinetobacter Baumannii İzolatlarında Biyofilm Yapımının Değerlendirilmesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Hacettepe Üniversitesi.
- Altuner, E. M., Canli, K. ve Akata, I. (2014). Antimicrobial screening of *Calliergonella cuspidata*, *Dicranum polysetum* and *Hypnum cupressiforme*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(1), 539-545.
- Ammendolia, M. G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C. R. ve Baldassarri, L. (1999). Slime production and expression of the slime-associated antigen by *staphylococcal clinical* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3235-3238.
- Atalan, E. (2019). *Türkiye'de yetiştirilen pelemir bitkisinin [cephalaria syriaca (l.)] antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antibiyofilm özelliklerinin ve tohum morfolojisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Bartın Üniversitesi.
- Atalay, B. (2014). *Kazdağları'nda yetişen Lamiaceae familyasının bazı türlerinin biyolojik aktiviteleri* [Yüksek Lisans Tezi]. Balıkesir Üniversitesi.

- Balaban, M. (2018). *Meyve atığı ekstraktlarının antibiyofilm etkilerinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Gebze Teknik Üniversitesi.
- Balcı, U. (2017). *Çeşitli kekik ve nane türlerinin antistreptokokal ve antibiyofilm aktiviteleri* [Yüksek Lisans Tezi]. Fen Bilimleri Enstitüsü).Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
- Baselga, R., Albizu, I. ve Amorena, B. (1994). Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. *A review. Veterinary microbiology*, 39(3-4), 195-204.
- Baumann, A. R., Martin, S. E. ve Feng, H. (2009). Removal of Listeria monocytogenes biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*, 72(6), 1306-1309.
- Bektaş, D. (2014). *Limon otu (lippia citriodora) ekstraktı ve sitralin escherichia coli üzerine antimikrobiyel etkisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Uludağ Üniversitesi.
- Benek, A. (2020) *Bazı karayosunlarının antimikrobiyal, antioksidan ve antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Kastamonu Üniversitesi
- Benek, A., Şenturan, M., Şimşek, Ö., Canlı, K. ve Altuner, E. M. (2021). Bazı Karayosunu Türlerinin İn Vitro Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(3), 474-481.
- Bothwell, M. R., Smith, A. L. ve Phillips, T. (2003). Recalcitrant otorrhea due to Pseudomonas biofilm. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 129(5), 599-601.
- Bozyel, M. E. ve Merdamert-Bozyel, E. (2020). Ethnomedicinal uses of orchidaceae taxa in Turkish traditional medicine. *International Research Journal of Biological Sciences*, 9, 52-63.

- Canlı, K., Yetgin, A., Akata, I. ve Altuner, E. M. (2016). In vitro antimicrobial screening of *Aquilaria agallocha* roots. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(5), 178-181.
- Chénier, M. R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B. T., Lawrence, J. R. ve Greer, C. W. (2003). Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5170-5177.
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A. ve Nychas, G. J. E. 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104; 1586–1596
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., ve Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. ve Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711- 745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. ve Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Cotter, P.D., Gaban, C.G.M. ve Hill, C. 2000. Analysis of the role of *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response. *International Journal of Food Microbiology*. 60: 137-146.
- Davey, M. E. ve O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.

- Denizli, T. H. (2021). *Bipiridin ligandı içeren rutenyum bileşiğinin antibiyofilm ve antikanser aktivitesinin belirlenmesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Pamukkale Üniversitesi.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Donlan, R. M. ve Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Duarte, M. C. T., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M. ve Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 197-201.
- Duman, H. (21 05 2022). Sarıkızçayı. Bizimbitkiler (2013). <http://www.bizimbitkiler.org.tr>
- Ebru, Ö. N. E. M. (2016). Farklı *Juniperus L.* Türlerinin *P. Aeruginosa*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi. *Honor Committee*, 643.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 52-67.
- Flemming, H. C. ve Wingender, J. (2010). The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8, 623-633.
- Gao, Z., Zhong, W., Chen, K., Tang, P. ve Guo, J. (2020). Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from *Citrus medica L. var. sarcodactylis* Swingle against *Listeria monocytogenes*. *Industrial Crops and Products*, 144, 112036.

- Gilmore, K. S., Srinivas, P., Akins, D. R., Hatter, K. L. ve Gilmore, M. S. (2003). Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infection and immunity*, 71(8), 4759-4766.
- Güneş, N. (2015). *Organik bağcılıkta syrah üzüm çeşidi fidanlarına farklı dozlarda uygulanan Trichoderma harzianum ve Bacillus subtilis' in tutma ve gelişme üzerine etkileri* [Yüksek Lisans Tezi]. Namık Kemal Üniversitesi.
- Gürbüz, E. (2019). *Çeşitli bitkisel bileşiklerin biyofilm oluşumunu önleme özelliklerinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Eskişehir Teknik Üniversitesi.
- Gürbüz, O. (2019). *Sarıçay Havzası (Çanakkale) Florası* [Yüksek Lisans Tezi]. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi.
- Güven, G. (2015). *Escherichia coli suşlarında antibiyotik dirençliliği ve biyofilm oluşumunun araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Hacettepe Üniversitesi.
- Karabacak, E., Esen, Ö. Ü. O., ve Gürbüz, O. (2019). *Çanakkale Florası. Sertifikasyon Orman Genel Müdürlüğü Haziran Dergisi*, 1-14.
- Karaca, B. (2011). *Türkiye'den İzole Edilen Salmonella Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Tanımlanması* [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara Üniversitesi.
- Karaca, B., Akata, I. ve Çöleri Cihan, A. R. Z. U. (2017). *Lentinus edodes, Lactarius delicious ve Ganoderma lucidum'un antibiyofilm ve antimikrobiyal etkinlikleri*. Kastamonu Univ., *Orman Fakültesi Dergisi*, 17(4), 660-668.
- Karaca, B., Cihan, A. Ç., Akata, I., & Altuner, E. M. (2020). Anti-biofilm and antimicrobial activities of five edible and medicinal macrofungi samples on some biofilm producing multi drug resistant Enterococcus strains. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(1), 69-80.

Karaca, H. (2010). *Ozonlamanın marul, ıspanak ve maydanozlarda mikrobiyel inaktivasyon ve raf ömrü üzerine etkisi* [Doktora Tezi]. Ankara Üniversitesi.

Koç, G. ve Erginkaya, Z. (2020). Probiyotik *Bacillus coagulans*' ın Antilisterial ve Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 39, 60-67.

Jayaraman, A. ve Wood, T. K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual review of biomedical engineering.*, 10, 145-167.

İştar, E. H. (2018) *Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş metisiline duyarlı Staphylococcus aureus (MSSA) ve metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması* [Uzmanlık Tezi]. Başkent Üniversitesi:

McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E. ve O'Gara, J. P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 1.

Monroe, D. (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS biology*, 5(11), e307.

Nadell, C. D., Xavier, J. B. ve Foster, K. R. (2008). The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 206-224.

Önem, E. (2016). Farklı *Juniperus L.* Türlerinin *P. Aeruginosa*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi. *Honor Committee*, 643.

Öztürk, Ş. B., Sakarya, S., Öncü, S. ve Ertuğrul, M. B. (2008). Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klinik Dergisi*, 21(3), 79-86.

- Pereni, C. I., Zhao, Q., Liu, Y. ve Abel, E. (2006). Surface free energy effect on bacterial retention. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48(2), 143-147.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall–Stoodley, L. ve Ehrlich, G. D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 12(3), 185-190.
- Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*, 50(1), 30-35.
- Shrout, J. D., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. ve Parsek, M. R. (2011). The Contribution of Cell-cell Signaling and Motility to Bacterial Biofilm Formation. *MRS bulletin*, 36(5), 367-373.
- Tozyılmaz, V. (2019). *Anadolu florasına ait bazı endemik türlerin antimikrobiyal, antioksidan ve antibiyofilm aktivitelerinin incelenmesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Bartın Üniversitesi.
- Top, R. (2018). *Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Bartın Üniversitesi.
- Turgut, B. C. (2016). *Türkiye’de yayılış gösteren bazı ağaç türlerine ait uçucu yağların anti-biyofilm etkilerinin belirlenmesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Pamukkale Üniversitesi.
- Tozyılmaz, V., Bülbül, A. S. ve Ceylan, Y. C. (2021). Determination of Antimicrobial, Antioxidant and Antibiofilm Activity of Some *Alyssum* L. Species in Anatolian Flora. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(4), 715-724.

- Uysal, I. ve Öztürk, M. (1991). *Digitalis trojana* Ivan. endemik türünün morfolojisi, anatomisi ve ekolojisi. *Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dergisi*, 3(1), 53-61.
- Ülgen, H. (2019). *Türkiye’de yetiştirilen ketencik bitkisinin [camelina sativa (l.) crantz] antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antibiyofilm özelliklerinin ve tohum morfolojisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi]. Bartın Üniversitesi.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. ve Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and infection*, 4(4), 481-489.
- Yağan, B. D. (2018). *Hypericum sp. cinsi* bazında Kazdağları’nda yetişen şifalı bitkilerin faydaları ve korunması üzerine bir araştırma. 2. *Uluslararası Rating academy Congress on Hope*, Çanakkale, Türkiye, 19 - 21 Mayıs 2018, ss.59
- Yavuz, M., & Korukluoğlu, M. (2010). *Listeria monocytogenes'* in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1), 1-10.
- Yonsel, Ş. (2010). *Bacillus subtilis* içeren küf ve bakterilere karşı koruyucu biyosidal ürün. 1. *Ulusal Biyosidal Kongresi*, 4-7.
- Yüzbaşıoğlu, E. (2010). *Reşadiye (A6, Tokat, Türkiye) ve çevresinin etnobotaniği* [Yüksek Lisans Tezi]. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi.