



**ÇEŞİTLİ BİTKİSEL BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNU ÖNLEME
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ece GÜRBÜZ

Danışman; Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Eskişehir, 2019

**ÇEŞİTLİ BİTKİSEL BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNU ÖNLEME
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ece GÜRBÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN**

**Eskişehir
Eskişehir Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ağustos 2019**

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1803F065 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ece GÜRBÜZ'ün “Çeşitli Bitkisel Bileşiklerin Biyofilm Oluşumunu Önleme Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı tezi 01/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Genel Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Jüri Üyeleri</u>	<u>Ünvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	:Doç. Dr. Semra MALKOÇ	
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Aysel GÜLBANDILAR	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ÇEŞİTLİ BİTKİSEL BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNU ÖNLEME ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ece GÜRBÜZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan, su veya su buharı destilasyonu ile elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, fakat bazen donabilen, uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Uçucu yağlar doğal antibiyofilm etkili ajanlardır. Uçucu yağların yapısında bulunan alkoller vejetatif hücrelere karşı bakteriyostatik aktiviteden çok bakterisidal etkilidirler. Aldehitler güçlü elektronegatiflikleri nedeniyle güçlü antibiyofilm aktiviteye sahiptirler. Elektronegatif bileşikler protein ve nükleik asit gibi yaşamsal zorunlu bileşiklerle reaksiyona girerek mikroorganizma gelişimini inhibe eder ve biyofilm oluşumunu engeller. Bu çalışmada Ylang-ylang (*Cananga odorata*), Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), Bergamot (*Citrus bergamia*), Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağlarının gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ile gram negatif *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Escherichia coli* ATCC (35200) bakteri strainleri üzerinde antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. En yüksek antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteyi Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) ve Ylang-ylang (*Cananga odorata*) yağlarının göstermiştir. Bu yağlar enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde alternatif çözümler üretebilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Uçucu yağ, Antibiyofilm, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF SOME ESSENTIAL OILS

Ece GÜRBÜZ

Department of Biology

Programme in General Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, August 2019

Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Essential oils are volatile, strongly aromatic and oily mixtures which are obtained by plant or vegetable droplets, obtained by distillation of water or water vapor, but which are liquid at room temperature, but sometimes can be solid. Essential oils have natural antibiofilm effects. Alcohols in the composition of essential oils are bactericidal rather than bacteriostatic activity against vegetative cells. Aldehydes have strong antibiotic activity because of their strong electronegativity. Electronegative compounds inhibit the growth of microorganisms by reacting with vital compulsive compounds such as proteins and nucleic acids and prevent biofilm formation. The aim of this study was to investigate the antimicrobial and antibiofilm effects of Ylang-ylang (*Cananga odorata*), *Arbutus andrachne*, *Cedrus atlantica*, *Liquidambar orientalis*, Bergamot (*Citrus bergamia*), Jasmine (*Jasminum nudiflorum*) essential oils on gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) and gram-negative *Escherichia coli* ATCC (25922) and *Escherichia coli* ATCC (35200) bacterial strains. It was found that the highest antimicrobial and antibiofilm activity was obtained by Jasmine (*Jasminum nudiflorum*) and Ylang-ylang (*Cananga odorata*) essential oils. These essential oils, heva the potential to offer alternative solutions in the treatment of infectious diseases.

Keywords: Essantion oils, Antibiofilms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim dönemim boyunca desteklerini benden esirgemeyen, iyi, ahlaklı ve dürüst bir bilim insanı olmanın yanı sıra hayatta sorumluluklarını bilen, savaşmaktan korkmayan, her daim araştıran ilke ve etik kurallarına dikkat ederek çalışmalarını sürdüren bir bilim insanı olmayı öğreten sayın hocam Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e üç yıllık bu macera süresince sonsuz desteği için teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans eğitim dönemim boyunca verdikleri destekler ve anlayışları için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi(TICAM) çalışanları iş arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca beni yetiştiren bu günlere getiren vicdanlı, ahlak sahibi, sorumluluklarının bilincinde, okuyan, araştıran bir birey olmam konusunda sadece eğitim dönemim boyunca değil, her zaman desteklerini benden asla esirgemeyen canım ailem babam Rahmi GÜRBÜZ, annem Hayal GÜRBÜZ ve ağabeyim Emrah Burak GÜRBÜZ'e hep yanımda oldukları için sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca birlikte büyüdüğüm ve çok maceralar atlattığım en yakın arkadaşlarım Hazal DUMAN'a ve Gamze TUNCA'ya ayrıca Çağla UYGUN ve Yunus Emre ELMA'ya her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkürü borç bilirim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

27/08/2019

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

(İmza)

Ece GÜRBÜZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Gram Negatif ve Gram Pozitif Bakteriler	2
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	3
1.2. BİYOFİLM.....	4
1.2.1. Biyofilmin tanımı ve önemi	4
1.2.2. Biyofilmin tarihçesi	6
1.2.3. Biyofilmin yapısı.....	8
1.2.4. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma nedenleri.....	11
1.2.4.1. Savunma	11
1.2.4.2. Adhezyon ve kolonizasyon	12
1.2.4.2. Yaşanabilir çevre geliştirmek	12
1.2.4.4. Kommünite oluşturmak.....	12
1.2.5. İnsan sağlığı açısından faydalı biyofilmler.....	13
1.2.6. İnsan sağlığı açısından zararlı biyofilmler.....	13
1.2.7. Biyofilm oluşma basamakları.....	15

1.2.7.1. İnce tabakanın oluşumu.....	15
1.2.7.2. Tutunma (mikroorganizmaların uygun yüzeye geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak tutunması).....	15
1.2.7.3. Büyüme ve yüzey kolonizasyonu, mikrokoloni ve biyofilm oluşumu (fenotipik ve genotipik değişiklikler).....	16
1.2.7.4. Biyofilm hücrelerinin kopması.....	16
1.2.8. Mikroorganizmalar üzerinde biyofilm yapısının etkisi.....	16
1.2.9. Biyofilm ile çevrenin zararlı etkilerinden korunma.....	17
1.2.10. Biyofilm ile besin elde etme	17
1.2.11. Biyofilm ile yeni genetik özelliklerin kazanılması	17
1.2.12.Quorum Sensing Sistem (QSS-Mikrobiyal populasyon etkileşimi).....	18
1.2.13.Biyofilm ve antibiyotik direnç ilişkisi.....	18
1.3. Antimikrobiyal etki.....	19
1.3.1. Uçucu yağlar	20
1.3.1.1.Yasemin yağı (Jasmine essential oil).....	20
1.3.1.2. Sandal yağı (Arbutus andrachne)	21
1.3.1.3. Sedir yağı (Cedrus atlantica).....	22
1.3.1.4. Bergamot yağı (Citrus bergamia)	22
1.3.1.5. Günlük yağı (Liquidambar orientalis)	22
1.3.1.6. Ylang ylang yağı (Cananga odorata)	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM	24
2.1. Bitkisel Yağ Örnekleri.....	24
2.2. Test Mikroorganizmaları	24
2.3. Yöntem.....	24
2.3.1. Bakteri kültürlerinin hazırlanması ve canlandırma işlemi.....	24
2.3.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	24
2.3.2.1. Diskdifüzyon yöntemi.....	24

2.3.2.2. Disk buharlaşma yöntemi	25
2.3.2.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi	26
2.3.2.4. Biyofilm inhibisyonunun saptanması – ilk aşamadaki bakteri yapışması.....	27
3.BULGULAR	29
3.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	29
3.1.1. Diskdifüzyon yöntemi	29
3.1.2.Disk buharlaşma yöntemi.....	33
3.1.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi	39
3.1.4. Biyofilm inhibisyonunun saptanması – ilk aşamadaki bakteri yapışması..	45
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKÇA.....	64
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Gram negatif- gram pozitif hücre duvarı (Şimşek ve Bulut, 2012)	3
Şekil 1.2. Dış Plağı (Mah vd., 2001).....	5
Şekil 1.3. Kistik Fibrozis (Mah vd., 2001).....	5
Şekil 1.4. Mikrobiyal Biyofilm Görünümü (Çiftçi Z, 2005).....	6
Şekil 1.5. Kistik Fibroz (KB) hastalarından alınan balgamlarda bulunan gram negatif bakteri olan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve polimorfonükleer lökositler. (Høiby, 1977).....	7
Şekil 1.6. Hücre dışı polimerik maddeler farklı boyutlarda matris. (Flemming, vd., 2016).....	11
Şekil 1.7. <i>S.aureus</i> 'ta icaADBC genleri ve PIA/PNAG biyosentezi (Patti vd., 1994).	14
Şekil 1.8. <i>S.aureus</i> BAP geni (Lasa ve Penades 2006)	14
Şekil 1.9. Biyofilm oluşum aşamaları (DIANI vd., 2015)	15
Şekil 1.10. Yasemin yağında tanımlanan diğer bileşenler (de Groot ve Schmidt, 2017). ..	21
Şekil 1.11. Sandal Ağacı yağında tanımlanan diğer bileşikler (Groot ve Schmidt 2017).....	21
Şekil 1.12. Ylang-ylang yağında tanımlanan diğer bileşikler (Groot ve Schmidt, 2017).	23
Şekil 3.1. Ylang ylang (<i>Cananga odorata</i>) bitkisel uçucu yağının (10 µL) <i>Esheria</i> <i>coli</i> ATCC (35200) bakteri straini üzerine etkisi.	30
Şekil 3.2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) bitkisel uçucu yağının (10 µL) <i>Esheria</i> <i>coli</i> ATCC (35200), (10 uL) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) üzerine etkisi.....	30
Şekil 3.3. Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>) bitkisel uçucu yağının <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC (29213) üzerine 10 µL'de ve 5 µL'de etkisi.	31
Şekil 3.4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) bakterisi üzerine 5 µL'de etkisi.	32
Şekil 3.5. Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) bakterisi üzerine 10 µL'de etkisi.	32
Şekil 3.6. Chloromphenicol antibiyotiği <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) bakterisi üzerine 10 µL'de etkisi.	33

Şekil 3.7. Ylang Ylang (<i>Cananga odorata</i>) uçucu yağının <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) bakteri kültüründe 10 µL petri kapağında oluşan inhibisyon zonu.....	35
Şekil 3.8. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) uçucu yağının <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) bakterisi üzerinde etkisi 10 µL.....	35
Şekil 3.9. Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>) uçucu yağının 10 µL'lik aktarımında <i>Escherichia coli</i> ATCC (25922) kültürüne etkisi.....	36
Şekil 3.10. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200) bakterisi üzerine 10 µL etkisi.....	37
Şekil 3.11. Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200) bakterisi üzerine 10 µL etkisi.....	37
Şekil 3.12. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>) uçucu yağının <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) bakterisi üzerine 10 µL etkisi.....	38
Şekil 3.13. Chloromphenicol antibiyotiğinin <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200) bakterisi üzerine 10 µL etkisi	39
Şekil 3.14. Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) ve <i>Escherichia coli</i> ATCC (25922) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri	40
Şekil 3.15. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Escherichia coli</i> ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri	41
Şekil 3.16. Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Escherichia coli</i> ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri	42
Şekil 3.17. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC (35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Escherichia coli</i> ATCC(25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri	42
Şekil 3.18. Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>) uçucu yağının <i>Escherichia coli</i> ATCC(35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Escherichia coli</i> ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri....	43

Şekil 3.19. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>) uçucu yağının <i>Esheria coli</i> ATCC (35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Esheria coli</i> ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri	43
Şekil 3.20. Chloromphenicol antibiyotiği <i>Esheria coli</i> ATCC (35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Esheria coli</i> ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri....	44
Şekil 3.21. DMSO <i>Esheria coli</i> ATCC (35200) (a), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213) (b) ve <i>Esheria coli</i> ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri.....	44
Şekil 3.22. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) uçucu yağının (a) ve Chloromphenicol antibiyotiğinin (b) test mikroorganizmaları üzerine konsantrasyonu	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Hücre dışı polimerik maddelerin bakteriyel biyofilmlerde işlevleri (Flemming vd., 2016)	10
Tablo 3.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>), 2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>), 3.Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>), 4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>), 5.Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>), 6. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>), ve Chloromphenicol test bakterileri (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ATCC 35200 ve <i>E. coli</i> ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (µL/mm).....	29
Tablo 3.2. Disk Buhar Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>), 2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>), 3.Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>), 4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>), 5.Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>), 6. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>), ve Chloromphenicol test bakterileri (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ATCC 35200 ve <i>E. coli</i> ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (µL/mm).....	34
Tablo 3.3. Test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>), 2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>), 3.Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>), 4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>), 5.Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>), 6. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>), ve Chloromphenicol test bakterileri (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ATCC 35200 ve <i>E. coli</i> ATCC 25922) üzerindeug/ml cinsinden minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri.....	40
Tablo 3.4. Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	45
Tablo 3.5. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	47
Tablo 3.6. Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	48
Tablo 3.7. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	49
Tablo 3.8. Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	50

Tablo 3.9. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	51
Tablo 3.10. Chloromphenicol antibiyotiği yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları	52
Tablo 4.1. Agar Difüzyon Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>), 2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>), 3.Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>), 4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>), 5.Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>), 6. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>), ve Chloromphenicol test bakterileri (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ATCC 35200 ve <i>E. coli</i> ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (µL/mm).....	60
Tablo 4.2. Disk Buhar Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>), 2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>), 3.Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>), 4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>), 5.Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>), 6. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>), ve Chloromphenicol test bakterileri (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ATCC 35200 ve <i>E. coli</i> ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (µL/mm).....	61
Tablo 4.3. Test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>), 2. Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>), 3.Sandal ağacı (<i>Arbutus andrachne</i>), 4. Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>), 5. Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>), 6. Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>), ve Chloromphenicol test bakterileri (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ATCC 35200 ve <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922)üzerinde ug/ml cinsinden minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri	62
Tablo 4.4. Uçucu yağların test mikroorganizmaları üzerinde biyofilm inhibisyonunun saptanması.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CLSM	: Konfokal lazer tarama mikroskopi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EPS	: Hücre dışı polimerik bileşenler
ESCMID	: Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
KF	: Kistik Fibrozis
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüleri
MSSA	: Metisilin
MRSA	: Metisilin dirençli
MSCRAMM	: Adhezif matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri

1. GİRİŞ

Uçucu yağlar bitkilerin ve bitkilerden elde edilen bitkisel drogların yaprak, meyve, çiçek, kök ya da kabuk gibi kısımlarından su buharı destilasyonu ile elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan kuvvetli kokulu ve uçucu karışımlardır. Uçucu yağları elde etmede kullanılan başlıca yöntemler; destilasyon, çözücü süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve presyondur. Bu yağlardan elde edilen birçok madde, başta ilaç hammaddesi olarak veya koku verici maddenin yarı sentez yoluyla elde edilmesinde kullanılır. Ayrıca uçucu yağlar diyetetik, ağız bakım ürünleri, boyacılık, parfümeri, madencilik ve gıdanın tüm alanlarında geniş ölçüde kullanılmaktadır(Çalikoğlu vd., 2006).

Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleriyle *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* gibi bakteriler ve maya ve küf (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) üzerinde etkili olduğu birçok araştırmada rapor edilmiştir. Antimikrobiyal özelliklerine karşı gram negatif bakterilerin gram pozitif bakterilere kıyasla daha dirençli olduğu, gram negatif bakterilerin bu direncinin hücre duvarından kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Uçucu yağlarda bulunan kimyasal bileşikler dikkate alındığında antimikrobiyal etkinin tek bir mekanizmaya bağlı olmadığı görülmektedir (Toroğlu vd., 2006). Uçucu yağların antimikrobiyal etkisi yapı ve fonksiyon değişikliği ile sitoplazma zarında görülmektedir. Yüksek bitkilerden elde edilen antimikrobiyal maddeler, mikrobiyal metabolizmanın enzimatik reaksiyonlarını durdurabilir, ortamdaki besin maddelerinin alımını engelleyebilir, zarın yapısını değiştirebilir, çekirdek ve ribozomal seviyede enzim sentezini engelleyebilir(Uçan, 2008).

Biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılan en yaygın uygulama antimikrobiyal ajanların kullanımıdır. Fakat çoğu antimikrobiyal biyofilm oluşumunun kontrolünde genellikle etkisiz kalmaktadır. Uçucu yağların yapısında bulunan alkol ve vejetatif hücrelere karşı bakteriyostatik aktiviteden çok bakterisidal etkilidirler. Aldehitler güçlü elektronegatiflikleri nedeniyle güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Elektronegatif bileşikler protein ve nükleik asit gibi yaşamsal azotlu bileşiklerle reaksiyona girerek mikroorganizma gelişimini inhibe edebilirler(Dorman ve Deans, 2000). Mikroorganizma gelişimi engellendiği içinde popülasyon yoğunluğu artmaz ve biyofilm yapıları oluşmaz.

Bu çalışmada gram negatif ve gram pozitif bakteri gruplarını temsil eden test mikroorganizmaları kullanılmıştır. Gram negatif *Escherichia coli* bulaşması yaygın ve yüksek biyofilm oluşturma aktivitesine sahiptir.*Escherichia coli* özellikle su ve gıdalarda

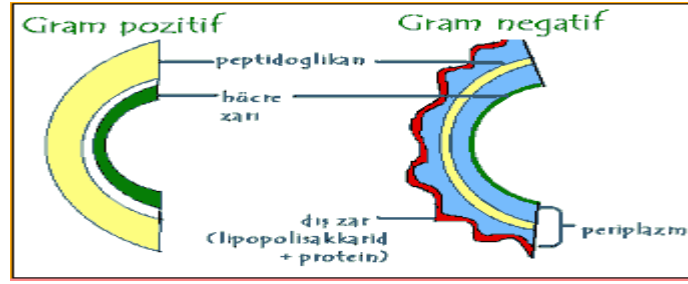
etkin biyofilm yapıları oluşturmaktadır. Su arıtma tesislerinde, gıda sanayinde bu bakteri ile savaş çok önem taşımaktadır. Gram pozitif *Staphylococcus aureus* straini gıda, tıp, alanlarında biyofilm yapıları oluşturarak olumsuz etkilere neden olmakta ve büyük zararlara yol açmaktadır. Hastane enfeksiyonlarına çok yüksek oranda neden olmasının yanı sıra tavşan, sığır, domuz etleri, süt, krema ve peynir başta olmak üzere çeşitli gıda zehirlenmesi vakalarına da yol açmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan Ylang-ylang (*Canaga odorata*), Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), Bergamot (*Citrus bergamia*) ve Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağlarının, bildiğimiz kadarıyla gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ile gram negatif *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Escherichia coli* ATCC (35200) bakteri strainleri üzerinde antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri araştırılmadığı için boşluğun doldurulması amaçlanmıştır.

1.1. Gram Negatif ve Gram Pozitif Bakteriler

Gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasındaki en önemli fark hücre duvarları arasındaki farktan oluşmaktadır. Bu hücre duvarı yapısındaki farklılıktan dolayı gram boyama tekniğiyle boyama sonrası gram pozitif bakteriler mor, gram negatif bakteriler ise pembe rengini verir. Gram boyama sonucunda bu farklı renk oluşumlarının gözlemlenmesi tamamıyla gram negatif ve gram pozitif bakteriler arasındaki hücre duvarı farkından kaynaklanmaktadır. Gram pozitif olarak adlandırılan bakterilerin hücre duvarı gram negatiflere göre çok daha fazla kalındır. Çok fazla miktarda da peptidoglikan içermektedir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı ise daha kompleks yapıdadır ve daha incedir. Gram negatiflerin hücre duvarı çok az miktarda peptidoglikan içerir ve en dışta lipopolisakkarit içerir.

Gram boyama tekniği sırasında hücreler öncelikle kristal mor adı verilen bir boya ile boyanırlar. Daha sonra alkolle yıkanılırlar. Alkolle yıkanmadan önce gram pozitif ve gram negatif hücreler mor gözükmektedirler. Ancak alkol yıkaması sonrası gram negatif bakterilerde alkol lipopolisakkarit içeren dış katman çözünür. Bunun sonucunda hücre içerisine alınmış kristal mor hücre dışına difüzyonla geçer. Bu durum sonucunda da pembe görüntü oluşmaktadır (Şimşek ve Bulut, 2012).



Şekil 1. 1. Gram negatif- gram pozitif hücre duvarı(Şimşek ve Bulut, 2012)

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus RNA dizileri sıralanışı bazında *Bacillus sp* ile gruplanmış gram pozitif bir bakteridir. Üzüm benzeri kümeler oluşturur ve anerobik koşullarda yaşar. Tıbbi alanda cilt enfeksiyonları ve gıda zehirlenmeleri gibi insan sağlığına zararlı enfeksiyonlara yol açar. Ayrıca ağır enfeksiyon travmalarına da yol açar ve insanda zatürre, enfeksiyöz endokardit, sepsis osteomyelit neden olur. Uygun konak bulunduğu biyofilm oluşturmaya meyillidir. Biyofilm yapısı oluşturarak dış çevreden en iyi şekilde faydalanır ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirir (Kuroda vd., 2001).

Bakteri özellikle insanlar da yüksek oranlarda kolonize olmaktadır. Yetişkin insanların ortalama %30-50 aralığında kolonize olmuştur. %10-20 oranında da dirençli kolonizasyon geliştiren bir bakteri olma özelliği taşımaktadır(Cengiz, 1999).*Staphylococcus aureus* tarafından kolonize olan kişiler sonradan oluşabilecek enfeksiyonlar için büyük bir risk oluşturmaktadırlar(Klaus vd.,1999). Özellikle intravenöz ilaç kullananlar, tip 1 diyabeti olanlar, immun sisteminin zayıfladığı hastalık gruplarına dâhil olanlar, hemodiyaliz hastaları bakterinin kolonize olmasında en riskli grubu oluşturmaktadırlar(Lowy, 1998). Çalışmada kullanılan strain Metisiline duyarlıdır.

1.1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli fakültatif anaerobik baskın bir bakteri türüdür. Geniş bir genetik araç dizisi çeşitliliğine sahiptir ve sık topluluk yaşam tarzına sahiptir. Çok yaygın bir bakteri türüdür. Labratuvar ortamında izole edilen strainlerinde planktonik kültürleri birçok izolatta in vivo ve in vitro biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir. Gastrointestinal sistemin fakültatif anaerobik bakterileri arasında baskın bir türdür (Beloin vd.,2008).

İnsanların ve diğer memeli canlıların bağırsak mikroflorasının önemli bir üyesidir. *Escherichia coli* rekombinant DNA teknolojisinde bir klonlama kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak birçok yararlı straini bulunan bakterinin aynı zamanda yüksek toksiteye sahip patojen türleride bulunmaktadır. Birçok farklı *Escherichia coli* straini insanlarda ve diğer memelilerde yüksek virülans etkiye sahip çeşitli bağırsak ve

ekstraintestinal hastalıklara neden olmaktadır. Çeşitli hastalıklara neden olan patotip içermektedir. En az altı farklı patotip diyare, dizanteri, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit ve ekstra bağırsak enfeksiyonları gibi hastalıklara neden olurlar (Kaper vd., 2004).

Escherichia coli'nin sahip olduğu virülans faktörler iyon sekresyonu, protein sentezi, mitoz, mitokondriyal fonksiyon olmak üzere çeşitli ökaryotik hücresel işlemleri etkileyebilir. Patojenik strainlerinin virülans faktörlerini kodlayan genler, hem komensal *Escherichia coli*'de bulunmayan hem de prototip spesifik düzenleyiciler ve hem de eşzamanlı *Escherichia coli*'de bulunan 'temizlik' düzenleyicileri tarafından düzenlenir (Kaper vd., 2004).

1.2. BİYOFİLM

1.2.1. Biyofilmin tanımı ve önemi

Biyofilm planktonik mikrobiyal hücrelerin biraraya gelerek popülasyon oluşturmaları, birbirlerine ve/veya bir yüzeye tutunarak hücre dışı ekzopolisakkarit ağısı bir yapı oluşturarak meydana getirdikleri 100-150µ boyutunda bir yapıdır. Ekzopolisakkarit EPS içerisinde gömülü bulunan tek bir mikroorganizmadan köken alan biyofilm yapısı oldukça kararludur ve kaygan, pürüzsüz bir yapıdır (Rijnaarts vd., 1993).

Bir diğer tanım ise; Biyofilm, gerekli besin kaynağını karşılayabileceği bir yüzey üzerinde büyüyen ve çevresi ekzopolisakkarit bir matriks ile çevrilmiş hücre popülasyonudur (Lewis, 2001). Planktonik hücreler dış etmenlere karşı kendilerini koruyabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri amacıyla Quorum Sensing (Çevresel Algılama sistemi) aracılığıyla bir araya gelirler ve dış çevresi matriks ile çevrili dayanıklı biyofilm yapılarını oluştururlar. Bu yapı oluşturulurken kendiliğinden üretilen bir matriks içerisinde gömülü bulunan planktonik hücreler bir araya toplanır ve toplanan mikroorganizmalar hücre dışı polimerik maddenin (EPS) birbirine ve/veya bir yüzeye yapışmasını sağlar (Vert vd., 2012). Kendiliğinden oluşan ve biyofilm oluşturmuş mikroorganizmaları dış çevreye karşı daha dirençli hale getiren EPS matrisi hücre dışı biyopolimerlerden oluşan polimerik bir yapıdır (Vert vd., 2012).

Tek hücreli bakteriler bir araya gelerek popülasyon oluştururlar ve çevrelerini saran ekzopolisakkarit matriks oluşturarak katı bir yüzeye tutunmuş biyofilm yapısını meydana getirirler. Biyofilm tek veya çoklu bakteri türlerinden meydana gelebilir. Örneğin; dış biyofilmlerini 500 den fazla bakteri türü bir araya gelerek biyofilm oluştururken akciğer hastalığı kistik fibrozis (KF)' de *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türü tek başına biyofilm

oluşturur. Biyofilm daha kararlı bir yapı olduğundan planktonik hücre ile karşılaştırıldığında biyofilm oluşturmuş mikroorganizma kolonilerinin antibiyotiklere karşı 10-1000 kat daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir(Mah vd., 2001).



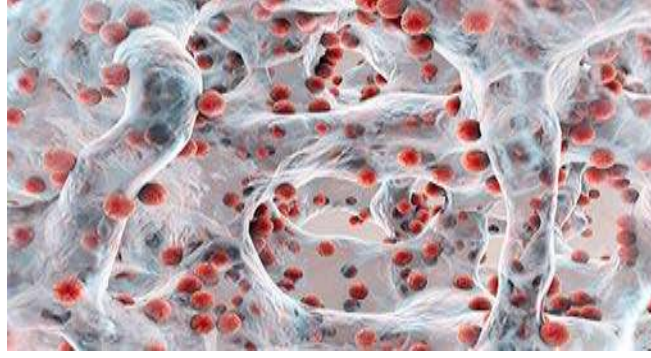
Şekil 1. 2.Diş Plağı(Mah vd., 2001).



Şekil 1. 3.Kistik Fibrozis(Mah vd., 2001).

Kararlı ve dirençli yapıdaki biyofilmler birçok tıbbi implatta, yapay kalçalar, kontak lenslerde oluşarak antibiyotik dirençleri sayesinde enfeksiyon oluşturmakta ve hastalara travma yaşatmaktadır. Enfeksiyonların tedavi maliyetini yıllık 1 milyon doları bulmaktadır (Mah vd., 2001).

Ayrıca sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde mikrobiyal biyofilmlerin oluşturduğu ürün kontaminasyonları, tıbbi alet ve cihazlarda oluşan biyofilmler sonucu oluşan enfeksiyon tedavileri, sanayi ve gıda sektöründe meydana gelen kontamineler sayesinde yıllık milyonlarca dolarlık kayıplar oluşmaktadır (Çiftçi, 2005).



Şekil 1. 4. *Mikrobiyal Biyofilm Görünümü* (Çiftçi Z, 2005).

Mikrobiyal kolonilerin bir araya gelerek oluşturdukları biyofilm yapılarının detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bakteriyel biyofilmeler doğada genellikle patojendir nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tüm mikrobiyal enfeksiyonların %65'ini ve tüm kronik enfeksiyonların ise %80'inin biyofilm oluşumuyla alakalı olduğunu ortaya koymuştur. Özetle bakteri biyofilminin anlaşılması ve üzerinde çalışmalar yürütülmesi sağlık alanında enfeksiyon nedenli hasta travmalarının önüne geçme ve sanayi, çevre sektöründeki bozulmalar-aksamaların önüne geçmede son derece önemlidir (Jamal vd., 2018).

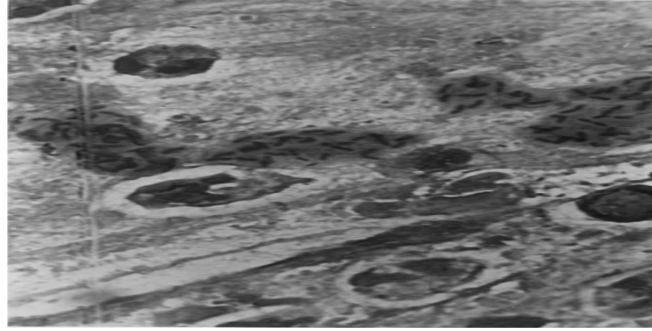
1.2.2. Biyofilmin tarihçesi

Günümüzde tıbbi cihazlardaki biyofilm oluşumlarının gözlemlenmesi, bulaşıcı hastalık topluluklarının meydana gelmesi ve kronik bakteriyel enfeksiyonların artışı biyofilm mekanizmasını anlama, araştırma ve önleme zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Biyofilm araştırmalarının modern dönemi Osaka'da beşinci Uluslararası Mikrobiyal Ekoloji Derneği toplantısında Doug Caldwell ve grubunun, opak yüzeylerdeki canlı sulu örneklerin incelenmesi sonrası konfokal tarama lazer mikroskobunun ortaya çıkarılması ile başlamıştır. Geçmiş dönemlere bakıldığında da birçok araştırmacının biyofilm yapıları ile karşılaştığı ve araştırmalarını bu yönde devam ettirdikleri gözlemlenmektedir (Costerton, 2004).

17 yy. da Anthony van Leeuwenhoek Hollanda 'da kendi ağzından örnek alarak ilkel mikroskopu ile incelemeler yapmış ve ilk biyofilm gözlemlerini gerçekleştirmiştir. Pasteur ise 19.yy'da şarabın oluşmasına neden olan mikroorganizmaları incelemiş ve biyofilm oluşumlarını gözlemlemiştir. Ancak o zamanlarda biyofilm yapıları ile alakalı olarak mikrobiyologların bilgileri bulunmamaktaydı (Høiby, 2017).

Deniz mikrobiyologları tarafından 1923 yılına kadar mikroorganizmaların planktonik canlılar halinde yaşamlarını devam ettirdiklerine inanılmaktaydı. Bakteriyel yapışma, tutunma ve birarada yaşama anlamına gelen film terimi 1923 yılında ABD Deniz Kuvvetleri Bakanlığı'na gelen raporlarda gemi altında birçok biyolojik kirlenmenin olduğu şeklinde bildirilmiş ve kullanılmıştır. Bu durumda sonra deniz biyologları suda meydana gelen biyolojik kirlenmeleri araştırmaya başlamıştır. Kirlenmenin erken gelişimi araştırmak amacıyla ZoBell ve Allen bakterilerin yapışma ve büyümesini araştırmaya başlamışlardır. (Høiby, 2017).

Tıp alanında biyofilmlerin ilk gözlemlenmeleri Kistik Fibrozis(KF) hastalığından hayatını kaybetmiş insanların akciğerlerinden alınan parçaların mikroskopik incelemesi sonrası 1972 yılında ortaya çıkmıştır. Bu incelemelerde görülmüştür ki *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi akciğer üzerinde biyofilm oluşturarak kistik fibrozis enfeksiyonuna neden olmakta ve insanlar hayatlarını kaybetmektedir (Høiby, 2017).



Şekil 1. 5. Kistik Fibrozis(KB) hastalarından alınan balgamlarda bulunan gram negatif bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* ve polimorfonükleer lökositler. (Høiby, 1977).

Biyofilm kelimesi teknik ve yazılı olarak ilk 1935 yılında teknik ve çevresel mikrobiyolojide kullanılmıştır. PubMed'de yapılan araştırmalarda biyofilm teriminin 1975 yılında yayımlanan bir makalede kullanıldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca ilk olarak biyofilm kelimesinin kullanıldığı iki tıbbi rapor bulunmaktadır. Bunlardan ilki 1981 yılında İşveç, Lund şehrinde diş hekimleri tarafından yayımlanmıştır. Bir diğeri ise 1985 yılında Costerton tıbbi mikrobiyoloji ile alakalı bir raporda artarak çoğalan mikrobiyal büyüme 'biyofilm' kelimesini kullanmıştır (Høiby, 2017).

1981 yılından itibaren biyofilm ile alakalı çalışmalarda gözle görülür bir artış meydana gelmiştir. 1996 yılına gelindiğinde Costerton ABD'nin Utah eyaleti Snowbird'de biyofilm konferansı yapmıştır. Bu konferansta biyofilm ve biyofilm

enfeksiyonları hakkında bilim insanları ve hekimlerle iş birliği başlatmıştır. Konferans sırasında farklı tıbbi uzmanlık alanları, çevre ve gıda sektöründe biyofilm etmeninin önemini, tıbbi cihazlarda yabancı cisim enfeksiyonları ve kronik enfeksiyonlarda biyofilmin neden olduğu konusunda hemfikir olunmuş ve bu konferanstan sonraki yıllarda biyofilm ile ilgili araştırmalarda ciddi sayıda artış gözlemlenmiştir. 21 Aralık 2016 verilerine göre sadece 2016 yılında yapılan biyofilm ile ilgili yayın sayısı 4455 kadar atmış ve toplam yayın sayısı 34580 olmuştur (Høiby, 2017).

1980 yılından önce yapılan çalışmalarda biyofilmler gözlemlenebilmeleri için ışık mikroskopları kullanılmaktaydı. Sonraki dönemlerde elektron mikroskobu ile resmedilmeler ve incelemelere geçilmiştir. 1990 ve sonrası yıllara gelindiğinde biyofilm çalışmaları sürdürülürken “Robbins biyofilm cihazı”, konfokal lazer taramaları, bakteri polyspecies mikroskobu, akış hücre otomatik biyolim analiz cihazı, Live-Dead boyama, transkriptomik analiz ve benzeri gibi cihazlar ve yöntemler kullanılmıştır (Høiby, 2017).

Costerton, ABD’nin Utah eyaleti Snowbird’de 1996 düzenlediği konferanstan sonra 2000 yılında ABD Montana’da bir konferans daha düzenlemiştir. 2006 yılına gelindiğinde Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (ESCMID) kurulmuştur. 2009 yılında Høiby ve Sternberg ESCMID lisansüstü teknik atölyesi Kopehang’da Danimarka Teknik Üniversitesinde Tıbbi biyofilm teknikleri üzerine araştırmalara başlamış ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavi yöntemleri 2015 yılında yayınlanmıştır (Høiby, 2017).

Sonuç olarak görülmektedir ki biyofilm kavramı ve enfeksiyon tedavileri ile alakalı çalışmalar son 50 yılda artarak devam etmektedir. Tıbbi cihazlarda bulaş, çevre-gıda sektörlerindeki biyofilm oluşumları ve bu oluşumlar sonusunda meydana gelen kronik bakteriyel enfeksiyon tanımlamaları ve tedavileri ile ilgili çalışmalar günümüzde de artarak devam etmektedir (Høiby, 2017).

1.2.3. Biyofilmin yapısı

Mikroorganizmalar dağılmış tek hücrelerin saf kültürleri olarak yaşamazlar. Yaşamlarını daha iyi sürdürebilmeleri için bir araya gelerek yaşamlarını sürdürürler. Mikroorganizmalar arayüzlere tutunurlar ve gerekli besin maddelerinin ortamda bulunması üzerine çoğalarak biyofilm oluştururlar. Biyofilmlerin çoğunda mikroorganizmalar kuru maddenin %10’unu oluşturur, matris ise %90 oranındadır. Matris çoğunlukla hücre dışı materyalden oluşmaktadır ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar bu matris içine

gömülü bulunmaktadır. Matris içinde hücre dışı olarak bilinen farklı tipteki biyopolimerler bir araya kümelenir ve polimerik maddeler (EPS) biyofilmin iskelesini oluşturur (Flemming vd., 2016).

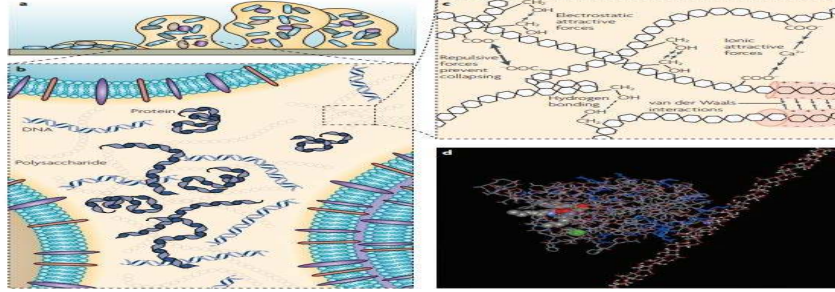
Matris içindeki EPS biyofilm içindeki hücreleri hareketsiz hale getirir. Bu hareketsiz tutma sayesinde hücre-hücre arası iletişim, etkileşim düzenli ve hızlı bir şekilde gerçekleşir. Tutma nedeniyle hücre dışı enzimlerden çok yönlü bir dış sindirim sistemi üretilir ve su fazında gelen parçacıklar besin ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar. Ayrıca EPS besin kaynağı olarak hücreler tarafından kullanılabilir. Ancak EPS bileşenleri yavaş yavaş biyolojik olarak çözünebilir ve karmaşık bir yapıdadır. Besin kaynağı olarak kullanılabilmesi için tüm bileşenlerin tamamen degradasyonu gereklidir. Matris biyofilm yapılarında hücre popülasyonlarını oksitleyici veya yüklü biyositlere karşı, metabolik katyonlara, bazı antibiyotiklere, ultraviyole ışınımına karşı korur (Flemming vd., 2016).

Tablo 1. 1. Hücre dışı polimerik maddelerin bakteriyel biyofilmlerde işlevleri (Flemming vd., 2016)

Fonksiyon	Biyofilmler İçin Uygunluk	İlgili Eps Bileşenleri
Yapışma	Abiyotik ve biyotik kolonileşmesinde ilk adımlara izin verir.	Polisakkaritler, proteinler, DNA ve amfifilik moleküller
Bakteriyel Hücrelerin Birikmesi	Hücreler arasında köprü kurmayı sağlar, geçici immobilizasyonu sağlar, bakteri popülasyonları, yüksek hücre yoğunluklarının gelişimini sağlar.	Polisakkaritler, proteinler ve DNA
Biyofilmlerin Birleşmesi	Aracılık, hidratlanmış bir polimer ağı (biyofilm matrisi) oluşturur. Biyofilmlerin mekanik stabilitesi (genellikle çok değerlikli katyonlar) ve EPS yapısı boyunca (kapşül, sümük veya kılıf), biyofilm mimarisini belirleme ve izin vermeyi sağlar.	Nötr ve yüklü polisakkaritler, proteinler (amiloidler ve lektinler gibi) ve DNA
Su Tutma	Etrafında yüksek oranda hidrate bir mikro-ortam sağlar.	Hidrofilik polisakkaritler ve muhtemelen proteinler
Koruyucu Bariyer	Sırasında belirli ve spesifik olmayan ana savunmalara karşı direnç sağlama, enfeksiyon ve çeşitli antimikrobiyal ajanlara tolerans kazandırır.	Polisakkaritler ve proteinler
Organik Bileşiklerin Sorpsiyonu	Çevreden besinlerin birikmesini sağlar.	Hidrofobik polisakkaritler ve proteinler
İnorganik İyonların Sorpsiyonu	Polisakkarit jel oluşumunu, iyon değişimini, mineralleri teşvik eder toksik metal iyonlarının oluşumu ve birikmesini sağlar.	Yüklü polisakkaritler ve proteinler, gibi inorganik ikame ediciler dahil fosfat ve sülfat
Enzimatik Aktivite	Besin için eksojen makromoleküllerin sindirimini sağlar.	Proteinler
Besin Kaynağı	Karbon, azot ve fosfor içeren bir kaynak sağlar.	Potansiyel olarak tüm EPS bileşenleri
Genetik Bilgi Değişimi	Biyofilm hücreleri arasındaki yatay gen transferini kolaylaştırır.	DNA
Elektron Verici Veya Alıcı	Biyofilm matrisinde redoks aktivitesine izin verir.	Proteinler (örneğin, pili venanoteller) ve muhtemelen hümeik maddeler
Hücre Bileşenlerinin İhracatı	Metabolik ciro sonucu hücresel materyali serbest bırakır.	Nükleik içeren membran vezikülleri asitler, enzimler, lipopolisakkaritler ve fosfolipidler
Fazla Enerji İçin Batarya	Fazla karbonu dengesiz karbon altında azot oranlarında depolar.	Polisakkaritler
Enzimlerin Bağlanması	Enzimlerin birikimi, tutulumu ve stabilizasyonunda sonuçlar Polisakkaritler ile etkileşimleri sayesinde	Polisakkaritler ve enzimler

EPS biyofilmin mimarisini oluşturur ve biyofilm içerisindeki hücreleri çevreler. Biyofilmin emme kapasitesi, konsantrasyonu, uyumu, niteliği, EPS'nin bileşenleri ve üç boyutlu matris mimarisi yaşam modunu belirler. Biyofilmlerin morfolojisi pürüzsüz, düz,

kaba, kabarık, veya filamentli olabilir. EPS matrisi, mikro etki alanları ayıran fiziksel bir yapı sağlar (Flemming vd., 2016).



Şekil 1. 6. Hücre dışı polimerik maddeler farklı boyutlarda matris. (Flemming, vd., 2016)

- Bakteriyel bir biyofilm modeli katı bir yüzeye bağlıdır. Biyofilm oluşumu, bir hücrenin bir yüzeye bağlanmasıyla başlar. Bir mikrokoloni oluşur. Bakteri bölünerek ve biyofilm matrisinin üretilmesi ile başlanır.
- Ana matris Bileşenler - polisakaritler, proteinler ve DNA - homojen olmayan bir düzende hücreler arasında dağılır.
- Zayıf fizikokimyasal etkileşimler ve sınıfları EPS matrisinin kararlılığına hâkim olan biyopolimerlerin karışması.
- Moleküler modelleme simülasyonu ekzopolisakarit aljinat (sağda) ve hücre dışı enzim lipaz (solda) arasındaki etkileşimi (Flemming vd., 2016).

1.2.4. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma nedenleri

Bakteriler uygun çevre şartlarının sağlandığı durumlarda biyofilm yapılarını oluşturmaya meyillidirler. Planktonik yaşama göre biyofilm oluşturarak ortak yaşamın etkisiyle dış çevreye karşı daha dayanıklı, kararlı ve dirençli hale gelirler. Daha detaylı bakılacak olursa bakterilerin biyofilm oluşturma nedenleri;

1.2.4.1. Savunma

Bakteriler için biyofilm oluşumu dış çevre şartlarına karşı dirençli, dayanıklı ve uzun ömürlülük açısından büyük önem taşımaktadır. Biyofilm oluşturan organizmalar besin yokluğu, pH değişikliği, dezenfektanlar, fagositoza, antibiyotiklere karşı planktonik hücrelere karşı daha dayanıklıdır. Biyofilmin matris yapısı ve büyük çoğunluğunu oluşturan EPS savunma mekanizmasında büyük öneme sahiptir. EPS bulunduğu bakteriyi

güç alanlarından uzaklaştırır ve fagositoza uğramasını önler. Ayrıca antibiyotik etkilerinden de biyofilm içerisindeki bakteri popülasyonlarını korur(Costerton vd., 1994).

1.2.4.2. Adhezyon ve kolonizasyon

Mikroorganizmaların yaşamlarının sürekliliğini sağlamak ve dış etkenlere karşı daha korumalı şekilde yaşamlarını devam ettirmeleri için gerekli ortam biyofilm oluşturmalarıdır. Özellikle canlı ortamlar mikroorganizmaların yapışmalarını ve çoğalmalarını sağlayabilmek için gerekli besin maddelerine fazlasıyla sahip ortamları oluşturmaktadır. Bakteri insan ve hayvan vücudunda sabit kalabilmek amacıyla farklı stratejiler geliştirmiştir. Bunlar adhezyon ve kolonizasyondur. Bakteri sahip olduğu yüzey yapışma proteinleri, konakçının sahip olduğu fibrinojen, vikronektin, fibronektin gibi matriks proteinlerine yapışır ve yerini sabitleyerek adhezyon işlemini gerçekleştirmiş olur. Sonraki aşama için ise kolonizasyon işlemine geçer. Kolonizasyon aynı türdeki moleküllerin birbirlerini çekmesi olarak özetlenebilir. Bu aşamada bakteri bir yandan bulunduğu ortamdaki popülasyonunu arttırırken bir yandan da biyofilm yapısını arttırmaya devam eder(Svensätervd., 2001).

1.2.4.2. Yaşanabilir çevre geliştirmek

İlk yapışma sonrası biyofilm yapısını arttırma ve popülasyon yoğunluğunu çoğaltma aşamasında konağa ait karbon kaynaklarının biyofilm gelişimi için son derece önem arz ettiği ortaya konmuştur. Konaktaki karbon katabolitleri bakterilerin gen regülasyonunu indükler ve konakçıya uygun yaşam ortamı oluşturur (Costerton vd., 1994).

1.2.4.4. Kommünite oluşturmak

Biyofilm oluşturmuş ve popülasyon yoğunluğunu arttırmış bakteri türleri ortama uygun hale getirdikleri genler sayesinde ortamdan aldıkları besin, pH, ısı vs. uyarılar sayesinde hızlıca planktonik halegeçebilmektedirler. Böylelikle değişen çevresel uyarılara karşı her bir planktonik bakteri komünitesi aynı cevabı vermiş olmaktadır. Bu durum biyofilm oluşturan bakterilerin kommünite yaşamları sayesinde gerçekleşmektedir(Öztürk vd., 2008).

1.2.5. İnsan sağlığı açısından faydalı biyofilmler

Bazı biyofilm türleri içme ve kullanma suları içerisindeki toksik maddeleri tutarak suları zararlı etkenlerden önemli ölçüde temizlemektedir. Biyofilm içerisindeki bakteriler sudaki toksik maddeleri parçalar ve böylelikle su kirliliğini önemli ölçüde azaltır (Sakarya S, 2018).

Vücut içerisinde ise bazı dokular üzerinde biyofilm yapısı oluşturan bakteriler dokuyu patajonlere karşı savunur ve korurlar. Bu duruma en güzel örnek mide-barsak kanalında bulunan laktik asit bakterileridir. Bu bakteriler buralarda patojen bakterilerin kolonize olmasını engellerler (Sakarya , 2018).

1.2.6. İnsan sağlığı açısından zararlı biyofilmler

Biyofilm oluşumu insan ve çevre sağlığı açısından çok olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Planktonik olarak yaşayan mikroorganizmalar biraraya gelip biyofilm oluşturunca antibiyotiklere karşı 10 kat daha dirençli hale gelmekte ve çevreye karşı daha sağlam ve dayanıklı hale gelmektedir.

Sağlık alanında en sık biyofilmin gözleendiğı hastalıklar şu şekilde sıralanabilir. Santral venöz kataterler, yapay kalp kapakları, üriner kataterler üzerinde oluşan biyofilm yapısından kaynaklı enfeksiyonlardır.

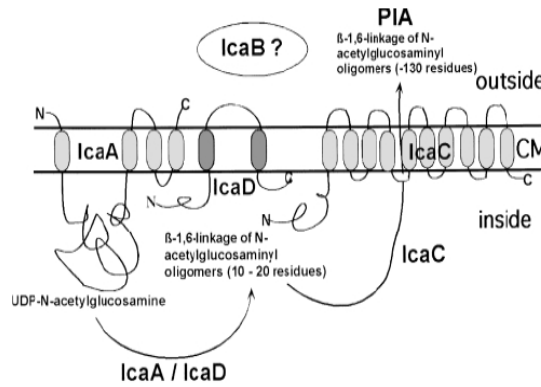
Bu biyofilm yapıları endokardit gelişime neden olmaktadırlar. Bu durumda sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar; stafilokoklar, streptokoklar, gram-negatif basiller, difteroidler, enterokoklar ve kandida türleridir (Stickler vd., 2002).

Çalışmada kullanılan üç bakteri straini insan sağlığı açısından zararlı biyofilm oluşturan bakterilerdir. Özellikle *Staphylococcus aureus* hastane ortamlarından insanlar üzerinde oldukça fazla enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Foster ve Höök 1998).

Staphylococcus aureus bakteri türünün biyofilm oluşumu iki basamakta gerçekleşir. İlk aşamada planktonik bakteriler uygun bir yüzey bulur, yapışır ve kolonize olurlar. (erken aderans) Yüzeye tutunma aşamasında “adhezif matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri '(MSCRAMM)adın da proteinler yüzeye yapışmayı sağlamaktadır. Bu aşamayı takip eden ikinci aşmada ise hücre-hücre adezyonu olmaktadır. Bu aşama sırasında çok katmanlı biyofilm yapısı detaylı olarak şekillenmektedir. *Staphylococcus aureus*’ta biyofilm oluşumundan icaADBC operonu ve ürünü olan “polysaccharide intercellula adhesin” (PIA) sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşumu aşamasında

etkin genlerin *icaA* ve *icaD* genlerinin sorumlu olduğunu yapılan çalışmalar ortaya koymuştur (Jefferson, 2004).

IcaA ve *IcaD* genlerinin görevi UDP-N-asetil glukozamini substrat olarak kullanarak şeker oligomerlerini sentezlemektedir. Genlerin sentezlediği oligomerlerin uzunluğu maksimum 20 rezidüdür. Bu oligomerler PIA spesifik anti-serumlarla reaksiyon verebilmektedir (Patti vd., 1994).



Şekil 1. *S.aureus*'ta *icaADBC* genleri ve PIA/PNAG biyosentezi (Patti vd., 1994).

Biyofilm oluşturabilen bakteri türlerinde ilk aşamada yüzeye tutunmadan çeşitli proteinlerin sorumlu olduğunu yapılan çalışmalar ortaya koymaktadır. *Staphylococcus aureus* mastitli sığırdan (*Staphylococcus aureus* V329) izole edilen “*biofilm associated protein*” (bap) biyofilm oluşumunda gerekli yapılardan birini oluşturmaktadır. BAP genine sahip olan *Staphylococcus aureus* bakteri straini daha güçlü biyofilm oluşturmaktadır. BAP geni bakterilerin yüzeyine yerleşmiştir. Yüksek molekül ağırlığına sahip, ardı ardına tekrarlayan C domainlerini içeren ve bulunduğu bakterilerde yüksek biyofilm oluşumuna olanak sağlayan bir gendir(Patti vd., 1994).



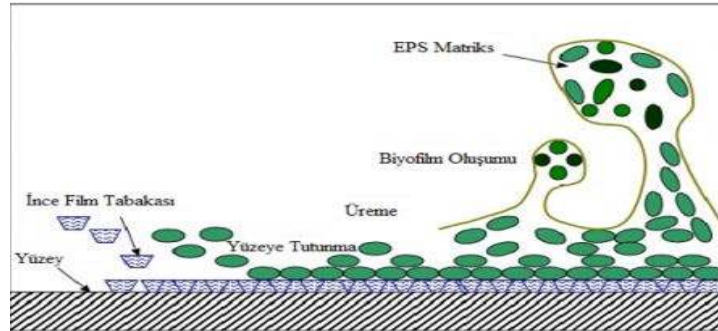
Şekil 1. *S.aureus* BAP geni (Lasa ve Penades 2006)

1.2.7. Biyofilm oluşma basamakları

Planktonik veya bakteri popölasyonları gerekli dış çevre oluştuğunda biyofilm oluşturmaya eğilimlidir. Geçmişten bu güne biyofilm ile ilgili yapılan araştırmalar ortaya koymaktadır ki biyofilm oluşumu bakterilerde bulunan ilgili genler sayesinde gerçekleşir. Bu genler bakteriler üzerinde öncelikle quorum sensing(evreyi algılama sistemi) ile sayıca popölasyonlarının arttırmalarını sağlar. Sonraki aşama hücre duvarı yapımı ve matriks oluşumudur. Bu aşamadan da sonra metabolizma, evre değişkenlerine cevap ve plazmide bağlanma aşamaları gerçekleşmektedir. Böylelikle biyofilm yapısı bir bütün halinde yaşamını sürdürmekte ve besin kaynaklarından ortak yararlanmaktadır. Ayrıca stres faktörlerine birlikte cevap verme ve besinden ortak fayda sağlamaktadırlar. Biyofilm oluşumu toplam beş aşamada gerçekleşmektedir(Vuong ve Otto 2002).

1.2.7.1. İnce tabakanın oluşumu

Mikroorganizmalar doğal ortamlarında doğrudan konak üzerindeki yüzeye tutunmazlar. Öncelikle tutunmalarını sağlayabilmeleri amacıyla ince bir tutunma yüzeyi oluştururlar (DIANI vd., 2015).



şekil 1. 9. *Biyofilm oluşum aşamaları (DIANI vd., 2015)*

1.2.7.2. Tutunma (mikroorganizmaların uygun yüzeye geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak tutunması)

Biyofilm oluşum aşamasında ince tabakanın oluşum aşamasından hemen sonra gelen bu aşamada bakteri hücreleri yüzeyle tam olarak temas kurmamaktadırlar. Öncesinde tutunmanın tam olarak gerçekleşmesi için bakteri hücreleri geri dönüşümlü tutunma gerçekleştirirler. Geri dönüşümlü tutunma bakteri hücresi ve yüzey arasındaki zayıf

etkileşimli bağlar oluşturulur. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van Der Waals bağları sayesinde gerçekleşir. Bu aşama sonunda bakteriler faz olarak yüzeye yakın kümelenmiş haldedirler. Ancak hala tam olarak tutunma gerçekleşmemiştir. Hemen sonrasında geri dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Bu aşamada ise geri dönüşlü tutunma sırasında yüzey üzerinde yeterli besin kaynağının olup olmadığı araştıran bakteri eğer yeterli besin kaynağı varsa geri dönüşümsüz tutunma fazına geçer(DIANI vd., 2015).

1.2.7.3. Büyüme ve yüzey kolonizasyonu, mikrokoloni ve biyofilm oluşumu (fenotipik ve genotipik değişiklikler)

Bu aşamada tutunmayı gerçekleştirmiş olan bakteri hücreleri gelişmeye başlar. Bir müddet sonrada bölünme başlar. Bu aşamada ilk tutunmayı başlatan bakteri kolonisi bölünerek popülasyonunu artırır sonraki aşama tutunma yapan diğer bakteri hücrelerinin de çoğalarak koloni oluşturmasıdır. Ayrıca oluşan EPS yapısı sayesinde planktonik bakteri hücreleri yakalanır ve biyofilm yapısına eklenirler. Böylelikle polimer matrikste kapsül oluşturan bakteri hücresi yoğunluklarında artış görülür. EPS sentezinin artması ile birlikte popülasyon yoğunluklarını arttıran bakteri kolonileri EPS içerisinde gömülü olarak yaşamaya başlarlar. Bu yapı biyofilm oluşturmuş bakterileri antibiyotiklere ve diğer çevresel etkenlere karşı daha dirençli hale getirir(DIANI vd., 2015).

1.2.7.4. Biyofilm hücrelerinin kopması

Biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerin farklı bölgelerde kolonize olabilmeleri yani etrafa yayılabilmeleri için bir takım dağılma mekanizmalarına ihtiyaçları vardır. Biyofilm içerisinde ortama yayılma iki şekilde gerçekleşebilir. Ya biyofilm içerisindeki planktonik bakteri hücresi farklı bir bölgeye yapışarak kolonileşme gösterir. Ya da bakteri kolonisi kopmayı gerçekleştirir ve farklı bir yere tutunup popülasyon arttırmaya devam eder. Kopma aşaması dış faktörler etkisiyle olabileceği gibi tek veya çoklu hücrelerin biyofilm içerisinde kopmasıyla da gerçekleşebilir(Diani vd., 2015).

1.2.8. Mikroorganizmalar üzerinde biyofilm yapısının etkisi

Bakteriler dış çevre faktörlerine karşı bir dizi avantajlar elde etmek amacıyla biyofilm yapısını oluştururlar. Biyofilm yapısındaki bakteriler planktonik bakterilere göre antibiyotik, dezenfektan ve ısıya karşı daha dirençlidirler. Bu nedenle planktonik bakteriler veya bakteri kümeleri hem in vitro hem de in vivo ortamlarda biyofilm yapısını

oluştururlar. Biyofilm oluşumu ile bakteri kolonizasyonları çevrenin zararlı etkilerinden korunur, çevreden daha rahat besin elde eder ve yeni genetik özellikler kazanır(DIANI vd., 2015).

1.2.9. Biyofilm ile çevrenin zararlı etkilerinden korunma

Biyofilm yapısı ile alakalı yapılan araştırmalar göstermiştir ki farklı biyofilm topluluklarında ekzopolisakkarit matriksin çeşitli ve önemli rolleri bulunmaktadır. EPS matriksi biyofilm içerisinde bir iyon değiştiricisi olarak davranır ve çeşitli ajanların biyofilm içerisine girip bakteri kolonizasyonlarını olumsuz etkilemesini önler. EPS matriksi aynı zamanda dış çevre faktörlerine karşı en etkin koruculardır. UV ışınlarına, ısı, kuruma, osmotik şok gibi dış çevre stres faktörlerine karşı biyofilm yapısındaki bakterileri en etkin şekilde korur. Doğal ve endüstriyel çevrelerde gelişen biyofilmlerin çeşitli kimyasal biyositler, amipler, bakteriyofaj gibi yapılara karşı duyarlı oldukları yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur. Tıbbi alanda ise oluşmuş biyofilm yapıları planktonik bakteri hücresi varlığına göre antibiyotiklere karşı daha fazla dirençli olmaktadır. Ayrıca biyofilm yapısını çevreleyen EPS yapısı bakteri kolonizasyonlarını savunma sistemi hücrelerine karşıda korumaktadır(DIANI vd., 2015).

1.2.10. Biyofilm ile besin elde etme

Biyofilm yapısında ki EPS yapısının dış çevreyi sağlam bir şekilde sarar ve koruma sağlar. Biyofilm yapısı sağlam matriks yapısının yanısıra içerisinde bulundurduğu kanal yapıları ilede kompleks bir yapı oluşturmaktadır. Biyofilmler içerisinde su kanalları bulunmaktadır. Bu su kanalları yüksek geçirgenliğe sahiptirler ve primitif bir dolaşım sistemi gibidirler. Bu kanallar sayesinde çevreden alınan besinler biyofilm içerisine eşit dağılır ve toksik maddelerde sağlıklı bir şekilde biyofilm içerisinden uzaklaştırılırlar(DIANI vd., 2015).

1.2.11. Biyofilm ile yeni genetik özelliklerin kazanılması

Biyofilm oluşumu planktonik bakterilerin tesadüfi olarak bir araya gelmesiyle oluşan bir yapı değildir. Bir araya gelen farklı türdeki bakteriler ortak bir amaç taşırlar. Biyofilm içerisindeki bakterilerin birbirleri ile konjugasyon aracılığıyla gen transferi yapması özellikle antibiyotik direncinin artmasında büyük rol oynar. Biyofilm içerisindeki bakteriler arası gen transferine en önemli örnek sığır bağırsağındaki biyofilm yapısı

verilebilir. Bu bağırsaktaki biyofilm içerisindeki bakterilerin görevi selülozü sindirmektir. Bu nedenle beş farklı bakteri bir araya gelerek bu biyofilm yapısını oluştururlar. Selülöz yıkımının başarıyla gerçekleştirilebilmesi için biyofilm içerisindeki bakteriler iş birliği halinde görev alırlar. Bu iş birliği içerisinde ilk olarak biyofilm ve selülöz arasında yer alan *Fibrobacter succinogenes* bulunur. Bu türün tam arkasında ise glikozu butirata dönüştüren *Butyrivibrio spp* yer alır. En son aşamada ise bu türlerin hemen yanında yer alan ve başka türe ait olan bakteriler butiratu asetada çevirir ve sonunda asetat özelleşmiş metajonen bakteriler tarafından metana dönüştürülür(DIANI vd., 2015).

1.2.12.Quorum Sensing Sistem (QSS-Mikrobiyal populasyon etkileşimi)

Biyofilm oluşumu farklı türlerdeki bakterilerin dış çevrede uygun koşulların ve yeterli besin miktarının bulunduğu ortamlarda bir araya gelerek oluşturdukları tesadüfi yapılar değildir. Geçmişten bu güne yapılan farklı çalışmalar göstermektedir ki biyofilm oluşumu hücreler arasında iletişim dizgeleri ile kontrol edilmektedir. Bakteriler arası iletişim dizgelerini hücreler arası sinyal molekülleri sağlarlar. Ökaryot ve prokaryotik hücrelerden salınan bu sinyal molekülleri planktonik bakterilerin bir araya gelerek populasyon yoğunluklarını arttırmaya neden olurlar. Ayrıca prokaryotik ve ökaryotik hücrelerden salınan bu sinyal molekülleri gen ekspresyonunu düzenleyen genlerle birlikte biyofilm yapımının düzenlenmesini sağlar ve patajonite, çevreye adaptasyonu düzenler. Çevreyi algılama sistemi “quorum sensing” olarak adlandırılan bu dizgeler biyofilm yapılarının virülens etkilerinin ayarlanmasında etkilidir (Şahin, 2007).

1.2.13.Biyofilm ve antibiyotik direnç ilişkisi

Biyofilm oluşumları doğal, endüstriyel ve tıbbi çevrelerde sık görülmekte ve çoğunlukla çevreyi olumsuz etkilemektedir. Doğal ve endüstriyel çevrelerde çeşitli kimyasal maddeler, amipler biyofilm yapılarını olumsuz etkilemektedir. Tıbbi alanda oluşan bakteriyel biyofilmler ise antibiyotiklere karşı direnç geliştirmişlerdir ve planktonik bakterilere karşı 10 kat daha fazla antibiyotiklere karşı duyarlıdırlar. Biyofilm yapılarının antibiyotiklere karşı bu denli direnç göstermelerinin bazı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir;

Antibiyotik içerisinde bulunan antimikrobiyal ajanlar biyofilm yapısını oluşturan matriks içerisinde bulunan polimerik maddeler nedeniyle difüzyonunu tam olarak

gerçekleştirememektedir. Bu durumda yeterli antibiyotik konsantrasyonuna ulaşılmamasını sağlamaktadır.

Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler arasında rezistan genlerinin aktarımı söz konusu değildir ve bu durum antimikrobiyal ajanlara karşı direnç sağlamaktadır.

Biyofilmi oluşturan hücresel bakterilerden bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş büyüme fazına girmektedirler (Şahin, 2007).

1.3. Antimikrobiyal etki

Essansiyal yağlar adıda verilen uçucu yağlar presleme veya distilasyon yoluyla bitkilerin bazı kısımlarından elde edilen kompleks karışımlardır. Düşük molekül ağırlıklı alifatik hidrokarbonları, alkoller, asitleri, aldehytleri, asiklik esterleri, laktonları, kumarinleri ve fenilpropanoislerin homologlarını içeren bileşiklerdir. Antibiyotik ve antiseptik özellikleriyle gıda bozulmalarına ve zehirlenmelerine neden olan *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* gibi bakteriler, maya ve küfler (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) üzerinde etkili olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır(Uçan, 2008).

Uçucu yağlar irrite edici, spazm çözücü, antiseptik ve antimikrobiyal özellikler göstermektedirler. Bitkilerden ve baharatlardan elde edilen uçucu yağlar, sahip oldukları antimikrobiyal aktivite nedeniyle gıda sanayinde kullanılan doğal olmayan koruyucu maddelere alternatif olabilirler. Ayrıca mikrobiyal bitki ve insan hastalıklarının kontrolünde de kullanılabilirler(Uçan, 2008).

Uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteyi belirlemede genel olarak kullanılan teknikler, agar difüzyon yöntemi, broth dilüsyon yöntemi ve disk difüzyon yöntemidir. Dilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak, kuyucuklara hazırlanan uçucu yağ ve diğer antimikrobiyal madde dilüsyonları, belirli miktarda kültür eklenerek etkileştirilir. Sonucunda kullanılan mikroorganizmaya karşı hangi uçucu yağın etkili olduğu kullanılan konsantrasyonda üremenin varlığına veya yokluğuna göre belirlenir. Agar difüzyon tekniğinde, besiyeri üzerine belirli çapta kuyulara uçucu yağ homojen eklenir ve inkübasyon süresi sonunda çukur çevresinde kullanılan madde etkili ise oluşan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilir. Disk difüzyon yönteminde ise mikroorganizma agar üzerine sürüm yapılır. Sonrasında belirli çapta steril diskler yerleştirilir ve oluşan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirme yapılır.

Uçucu yağların antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Uçan, 2000 µg/ml DL-limonen'nin *Saccharomyces cerevisiae* strainine uygulaması sonucu alkol fermentasyonunu inhibe edici etkide bulunduğunu gözler önüne sermiştir. Ayrıca DL-limonen maya çoğalmasını, şeker kullanımını, aroma maddeleri ve etil alkol miktarlarını da etkilemiştir.(Uçan, 2008)

Toroğlu, Dığrak ve Çenet 2006 yılında defne ve zencefil uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus brevis* mikroorganizmalarına karşı sinerjistik, diğer bakterilere karşı antagonistik etkili olduklarını bulmuşlardır.(Toroğlu vd., 2006)

Valero ve Salmeron, 11 farklı uçucu yağın havuç suyundaki *Bacillus cereus*'a karşı antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. Çalışmada defne ve karabiber yağlarının kullanıldığı hiçbir dozda antibakteriyel etki gözlemlenmezken, diğer yağlarda değişik düzeylerde lag fazını uzattıklarını gözler önüne sermişlerdir. En etkin uçucu yağ tarçın olarak belirlenirken kullanılan uçucu yağların etkinlik sırası tarçın, oregano, kekik, karanfil, adaçayı, biberiye, sasafra şeklinde olduğunu belirlemişlerdir. (Valero ve Salmeron 2003)

Mejlholm ve Dalgaard, kekik otu yağının %0.05 (v/w) oranında kullanımının morina balığı filetolarında bozulma reaksiyonlarını geciktirdiğini, tek koruyucu ve baharat olarak kullanılacaksa %1 veya daha fazla ihtiyaç duyulacağını belirtmişlerdir. Ancak yüksek oranda kullanım, kuvvetli aromaya neden olmaktadır. Limonotu uçucu yağı *Aspergillus flavus*'a karşı sıvı besiyerinde 0.6 mg/ml konsantrasyonda fungustatik etki gösterirken, 1.0 mg/ml konsantrasyonda fungusidaletki göstermiştir.

1.3.1. Uçucu yağlar

1.3.1.1. Yasemin yağı (*Jasmine essential oil*)

Yasemin yağı özellikleri parfümeri endüstrisinde tercih edilmektedir. Yasemin çiçeğinin işlenmesi kolay olmadığından ve çiçek yapısı kolay bozulduğundan dolayı geleneksel kimyasal damıtma yoluyla bitkisel yağ çıkarımı yapılamamaktadır. Bunun yerine heksan veya CO₂ gibi kiritik akışkanlar güzel kokulu kimyasalları çıkarmak için kullanılmaktadır. Bitkisel yağ çıkarılırken çözücü buharlaştırıldıktan sonra geriye viskoz bir ürün kalmaktadır. Bu ürün içerisinde yağ asitleri, parafinler, metil esterler ve yasemin çiçeklerinin balmumları bulunmaktadır (de Groot ve Schmidt 2017).

Yasemin uçucu yağı birkaç çiçeğin birleşmesinden elde edilebilmektedir. Ancak esas olarak Jasminum'dan, *grandiflorum* L. (İspanyol yasemini) ve *Jasminum sambac* (L.) Aiton (Arabistan, Çin, sambac yasemin)'ninden oluşturulmaktadır. Ayrıca özellikle Hindistan'da süs amaçlı ve dini ritüeller de kullanılmaktadır (de Groot ve Schmidt, 2017).

Constituent	CAS	Maximum Concentration			
Benzyl alcohol	100-51-6	3.7%	Methyl jasmonate	1211-29-6	7.2%
p-Cresol	106-44-5	4.9%	Methyl linoleate ^a	112-63-0	21.7%
Eugenol	97-53-0	6.8%	Methyl linolenate ^a	301-00-8	5.3%
α-Farnesene	502-61-4	3.4%	Methyl octadecanoate ^a	112-61-8	2.2%
(E,E)-α-Farnesene	502-61-4	3.2%	Methyl palmitate ^a	112-39-0	5.7%
Hexadecanoic acid*	57-10-3	2.5%	Nerolidol	7212-44-4	2.5%
(Z)-3-Hexenyl benzoate	25152-85-6	4.1%	Phytol (isomers)†	7541-49-3	52.5%
1H-Indole	120-72-9	5.5%	trans-Phytol acetate	10236-16-5	6.0%
Isophytol acetate	58425-36-8	7.3%	Squalene	111-02-4	5.7%
δ-Jasmolactone	25524-95-2	5.5%	Trimethyl-6,10,14-penta-decanone	502-69-2	3.2%
(Z)-Jasmone	488-10-8	9.5%			
Methyl anthranilate	134-20-3	3.0%			

Şekil 1. 10. Yasemin yağında tanımlanan diğer bileşenler (de Groot ve Schmidt, 2017).

1.3.1.2. Sandal yağı (*Arbutus andrachne*)

Dünya'da 3 çeşit sandal ağacı yağı yapılan ağaç türü bulunmaktadır. Bunlar; Doğu hint sandal ağacı yağı, *Santalum* L. Ahşabından oluşturulan sandal ağacı yağı ve Yeni Kaledonya sandal ağacı yağıdır. Ancak Yeni Kaledonya sandal ağacı 2008 yılından itibaren nesli tükenmekte olan türler listesinde olduğundan artık bu ağaçtan bitkisel yağ oluşturulmamaktadır(de Groot ve Schmidt, 2017).

Sandal ağacı yağı kimyasal olarak berrak, hafif viskoz, renksiz, pudra yapılı kahverengi bir sıvıdır. Ana üretilen ülke Avustralya'dır(de Groot ve Schmidt, 2017).

Compound	CAS	Minimum	Maximum
(Z)-α-Santalol	115-71-9	15.0	25.0
(Z)-β-Santalol	42495-69-2	5.0	20.0
(E,E)-Farnesol	106-28-5	2.5	15.0
(Z)-Nuciferol	1786-15-8	2.0	15.0
epi-α-Bisabolol	515-69-5	2.0	12.5
(Z)-trans-α-Bergamotol	88034-74-6	2.0	10.0
(Z)-Lanceol	859202-95-2	1.0	10.0
epi-β-Santalol		0.5	3.5

Şekil 1. 11. Sandal Ağacı Yağında tanımlanan diğer bileşikler(de Groot ve Schmidt 2017).

1.3.1.3. Sedir yağı (*Cedrus atlantica*)

Sedir ağacı yağı bileşenler için önemli bir doğal üründür. Koku birleşimlerinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak temizlik malzemelerinde; sabunlar, deterjanlar, dezenfektanlar, oda spreylerin içeriğine katılmaktadır.

Sedir ağacı yağı litaretürde geçmişten bugüne birçok araştırmada kullanılmıştır. Runeberg (1960- 1961) yıllarında Pilo ve Runeberg 1960; Pettersson ve Runeberg 1961 çalışmalarında sedir ağacı içeriğinde alfa-cedren ve cedrol içerdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, daha yakın bir zamanda, Kitchens ve ark. (1971) beta-cedren, thujopsen, widdrol, psödödrol, beta-chamigren, primer cedrol, widren, isowiddrene, alfa-chamigren ve cuparen (üç izomer) bulunduğunu araştırmalarında ortaya koymuşlardır (Adams, 1991).

1.3.1.4. Bergamot yağı (*Citrus bergamia*)

Bergamot yağı güney İtalya'daki Reggio Calabria eyaletinin tipik bir meyvesidir. Esas olarak esensial yağ olarak kullanılmaktadır. Antibakteriyal ve antiseptik aktivitesi nedeniyle ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bergamot kabuğu pektinler ve flavonoidler gibi çok faydalı bileşikler içermektedir. Kabuğu, narenciye, flavanone rutinosides ve naringenin, eriodictyol ve hesperetin'den elde edilen neo-hesperosidlerin karakteristik özelliklerini içerir(Mandalari vd.,2007).

1.3.1.5. Günlük yağı (*Liquidambar orientalis*)

Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) gövde kabuğunun yaralanması sonucu storax elde edilmektedir. Günlük ağacı odunu ve kabuğunun bazı çözünürlükleri ile ana bileşenleri geçmişten bugüne yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarlagünlük ağacı odununun; soğuk su çözünürlüğü %5,3; sıcak su çözünürlüğü %5,5; alkol-benzen çözünürlüğü %12,8; holoselüloz miktarı %73,7; selüloz içeriği %42,4; lignin oranı %25,7 ve kül yüzdesi %0,8 olarak bulunmuştur. Günlük ağacı kabuğunda ise soğuk su, sıcak su ve alkol benzen çözünürlükleri sırasıyla %4,9, %8,3 ve %15,9 olarak bulunmuştur. Kabukta holoselüloz yüzdesi %55,9, selüloz miktarı %26,3, lignin ve polifenol içeriği %42,0 ve kül oranı %4,1 olarak belirlenmiştir(Aydınöz ve Bulut, 2014).

1.3.1.6. Ylang ylang yağı (*Cananga odorata*)

Ylang-ylang yağı, *Cananga ylang-ylang* ağacının çiçeklerinden elde edilmektedir. *Cananga* ağacı genel olarak Endonezya ve Filipinler’de bulunmaktadır. Orta büyüklükteki ağacın boyu 10 ile 30 m arasında değişkenlik göstermektedir. Ylang-ylang yağı parfümeride, sabun ve cilt losyonlarında kullanılmaktadır. Ayrıca dondurma, şekerleme, sakız ve unlu mamüllerde lezeetlendirici madde olarak ta kullanılabilir. Ylang-ylang yağı kimyasal olarak soluk sarımsı rekte berrak sıvıdır(de Groot ve Schmidt, 2017).

Compound	Extra*	First†	Second‡	Third§
Benzyl acetate	5.5–17.5	4.0–12.0	0.5–8.8	0.1–3.0
Benzyl benzoate	3.0–6.0	4.2–8.0	4.5–10.0	4.0–8.5
Benzyl salicylate	1.2–4.0	1.6–4.0	1.8–4.0	2.0–5.0
β-Caryophyllene	2.5–8.5	4.0–12.0	4.8–17.0	5.0–19.0
(E)-Cinnamyl acetate	0.5–6.5	0.5–5.0	0.4–0.8	0.1–2.5
p-Cresyl methyl ether	5.0–16.0	3.0–10.0	1.0–5.0	0.1–1.4
(E,E)-α-Farnesene	1.0–15.0	3.0–18.0	5.0–21.0	9.0–29.0
(E,E)-Farnesol	0.8–3.0	0.1–2.5	0.8–3.5	0.8–4.0
(E,E)-Farnesyl acetate	0.5–3.0	1.0–4.0	1.0–3.5	1.5–5.0
Geraniol	0.1–3.0	0.1–2.6	0.1–2.4	tr-0.8
Geranyl acetate	2.5–14.0	2.0–15.0	1.7–12.0	0.4–6.6
Germacrene D	5.0–20.0	9.5–24.0	13.0–28.0	15.0–35.0
Linalool	7.0–24.0	3.0–19.0	2.0–9.5	0.1–4.0
Methyl benzoate	4.0–9.0	1.5–5.5	1.0–3.5	0.1–0.9
3-Methyl-2-butenyl acetate	0.6–2.3	0.2–1.8	0.1–0.9	tr-0.2

Şekil 1. 12. Ylang-ylang yağında tanımlanan diğer bileşikler(de Groot ve Schmidt, 2017).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitkisel Yağ Örnekleri

Araştırma için altı farklı bitkisel yağ materyalinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu bitkisel yağlar Ylang-ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağ, Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağ, Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağ, Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağ, Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağ, Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağlarıdır. Uçucu yağlar Oshadhi firmasından satın alınmıştır.

2.2. Test Mikroorganizmaları

Yapılan çalışmada bitkisel uçucu yağların gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde antibiyofilm aktivitesi incelenmiştir. Bu nedenle gram pozitif olarak *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) straini, gram negatif olarak ise *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) strainleri kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.3. Yöntem

2.3.1. Bakteri kültürlerinin hazırlanması ve canlandırma işlemi

Çalışmada patojen mikroorganizma gruplarından *Staphylococcus aureus* ATCC (29213), *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) kullanılmıştır. Stoktan alınan bakteriler MHA üzerine çizgi ekim yapılmış ve 20-24 saat 37 °C’de inkübasyon edilmiştir. Sonrasında tekli saf koloniler alınmış ve MHB tek kuvvetli besiyerine ekim yapılmış ve 20-24 saat çalkalamalı etüv (150 rpm) ile geliştirilmiştir.

2.3.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

2.3.2.1. Diskdifüzyon yöntemi

Bitkisel uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Zaidan vd., 2005). İlk aşamada stoktan alınan bakteri kültürleri MHA üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37 °C’de 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki aşamada çizgi ekim sonrası saf koloniler toplanmış ve sıvı MHB tek kuvvetli besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Çalkalamalı etüvde (150 rpm) devirde 37 °C’de 24 saat

inkübasyon sonrası oluşan kültürler çift kuvvetli MHB 'a alınmış ve 108 kob/mL (0.5 McFarland Bulanıklık değerine karşılık gelen bulanıklık) olacak şekilde kültürler hazırlanmıştır. Her bir petriye 20 mL MHA dökülmüş ve 30 dk kapakları yarı açık şekilde steril kabin içerisinde bırakılarak kuruması sağlanmıştır. Sonrasında 0.5 McFarland'a ayarlanan bakteri külürlerinden steril pipet ile 100 µL alınmış ve petrilerin üzerine aktarılmıştır. Steril drigalski spatülü ile 100 µL aktarılan bakteri kültürleri MHA üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Kuruması için 20 dakika steril kabin içerisinde kapakları yarı açık kurumaya bırakılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenebilmesi için whatman kağıdından yararlanılmıştır. 10-10 mm çaplı Whatman kağıtlarına bakteri kültürleri üzerinde antimikrobiyal aktivitesine bakılacak olan bitkisel uçucu yağlardan 5 ve 10 µL sterik mikropipet ile damlatılmıştır. Bir grupta aynı bitkisel yağ içeriğinin 5 ve 10 µL'si whatman kağıdına damlatılmış ve petride bakteri kültürü yayılmış MHA üzerine yerleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Chloromphenicol antibiyotik kullanılmış, negatif kontrol olarak ise MHB kullanılmıştır. Petrilere bakteri kültürleri yayıldıktan ve bitkisel yağlar whatman kağıdı ile aktarıldıktan sonra 37 °C'de etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası whatman kağıdı çevresinde oluşan inhibasyon zonlar mm bölmeli cetvel sayesinde ölçülerek kaydedilmiş ve tablo haline getirilmiştir. Bütün deney iki paralel olarak kontrollü bir şekilde yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler alınarak kaydedilmiştir.

2.3.2.2. Disk buharlaşma yöntemi

Bitkisel uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi disk buharlaşma yöntemi ile belirlenmiştir(Zaidan vd., 2005). İlk aşamada stoktan alınan bakteri kültürleri MHA üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki aşamada çizgi ekim sonrası saf koloniler toplanmış ve sıvı MHB tek kuvvetli besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Çalkalamalı etüvde (150 rpm) devirde 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası oluşan kültürler çift kuvvetli MHB 'a alınmış ve 10⁸kob/mL (0.5 McFarland Bulanıklık değerine karşılık gelen bulanıklık) olacak şekilde kültürler hazırlanmıştır. Her bir petriye 20 mL MHA dökülmüş ve 30 dk kapakları yarı açık şekilde steril kabin içerisinde bırakılarak kuruması sağlanmıştır. Sonrasında 0.5 McFarland'a ayarlanan bakteri külürlerinden steril pipet ile 100 µL alınmış ve petrilerin üzerine aktarılmıştır. Steril drigalski spatülü ile 100 µL aktarılan bakteri kültürleri MHA üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Kuruması için 20 dakika steril kabin içerisinde kapakları

yarı açık kurumaya bırakılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenebilmesi için whatman kağıdından yararlanılmıştır. 10-10 mm çaplı Whatman kağıtlarına bakteri kültürleri üzerinde antimikrobiyal aktivitesine bakılacak olan bitkisel uçucu yağlardan 5 ve 10 µL steril mikropipet ile damlatılmıştır. Bir grupta aynı bitkisel yağ içeriğinin 5 ve 10 µL'si whatman kağıdına damlatılmış ve petrinin kapağına yerleştirilmiştir. Burada amaç bakteri kültürlerinin solunumları üzerinde bitkisel uçucu yağların etkilerinin gözlemlenmesidir. Pozitif kontrol olarak Chloromphenicol antibiyotik kullanılmış, negatif kontrol olarak ise MHB kullanılmıştır. Petrilere bakteri kültürleri yayıldıktan ve bitkisel yağlar whatman kağıdı ile aktarıldıktan sonra 37 °C'de etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası whatman kağıdı çevresinde oluşan inhibasyon zonlar mm bölmeli cetvel sayesinde ölçülerek kaydedilmiş ve tablo haline getirilmiştir. Bütün deney iki paralel olarak kontrollü bir şekilde yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler alınarak kaydedilmiştir.

2.3.2.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Minimum İnhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK) için CLSI kılavuzuna (CLSI 1990) ait (Ulusal Komite) göre mikro seyreltme teknikleri ile sıvı halde Muller Hinton Broth'a (MHB) ekim yapılarak 96 kuyulu plate üzerinde gerçekleştirilmiştir (Bazargani vd., 2016).

Her bir mikroorganizma kültürü stoktan MHA üzerine çizgi ekim yapılmıştır. Sonrasında 20-24 saat arası 37 °C'de etüvde inkübasyon edilmiştir. Çizgi ekim üzerinde canlandırma işlemi yapılan mikroorganizma kültürlerinin saf kolonileri kürdan yarımıyla toplanılmış ve tek kuvvetli MHB'a ekimi gerçekleştirilmiştir. MHB içerisinde 37 °C'de 20-24 saat arası çalkalamalı etüvde (150 rpm) ile geliştirilmiştir. Çift kuvvetli MHB hazırlanmış ve 20 mL steril deney tüplerine aktarılmıştır. Etüvden alınan bakteri kültürleri çift kuvvetli MHB üzerine aktarılmış ve bulanıklık 10^8 kob/mL konsantrasyona (0.5 Mcfarland ile) ayarlanmıştır. Mikro seyreltme tekniği ile dilüsyon hazırlanabilmesi amacıyla her bir bitkisel uçucu yağ için ve pozitif kontrol grubunu oluşturan antibiyotik Chloromphenicol için 10'ar adet olmak üzere toplam 70 adet eppendorf hazırlanmıştır. 96 kuyulu plate'de 12 kuyucuk olmasına rağmen 10 adet eppendorf hazırlanmasının nedeni plate aktarımı sırasında 1. Kuyuya saf yağ ve 12. Kuyuya saf steril su eklenmesidir. Eppendorflar 2'den 10'a kadar numaralandırılmıştır. 3'ten 11. Eppendorfa kadar her birine 500 µL saf steril su eklenmiştir. 2. Eppendorfa ise 500 µL saf bitikisel uçucu yağ ve üzerine çözücü olarak 500 µL DMSO eklenmiştir. (Uçucu yağlar için tüm testler yağ

çözünürlüğünü arttırmak için DMSO takviye edilmiş maksimum %2 (v/v) konsantrasyonda yapılacaktır.) 2.eppendorfta 500 µL uçucu yağ ve 500 µL DMSO karıştırılmış ve 500 µL'si 3. Eppendorfa aktarılmıştır. 3. Eppendorfta karıştırılan uçucu yağ, DMSO ve saf su karışımı karıştırılarak 4. Eppendorfa aktarılmış ve bu işlem 11. Eppendorfa kadar seyreltme tekniği ile devam etmiştir. Bitkisel uçucu yağlardan 1:2 dilüsyon serileri olacak şekilde 10 eppendorf hazırlanmıştır. Seyreltme tekniği ile hazırlanan dilüsyon işleminin sonrasında toplam 10 eppendorfta dilüsyonlar her bir yağ için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Dilüsyon hazırlanma işleminden sonra 96 kuyulu plate'e aktarma işlemine geçilmiştir. Aktarma sırasında her bir bitkisel uçucu yağdan (Ylang-ylang, Sedir, Sandal, Bergamot, Yasemin, Günlük uçucu yağları ve Chloromphenicol) 96 plate'in ilk kuyusuna 100 µL steril mikropipet ile eklenmiştir. 2. Kuyudan itibaren eppendorflarda hazırlanan dilüsyonlardan 100 µL mikropipet ile alınarak 12.kuyuya kadar her bir kuyuya 100 µL aktarımı yapılmıştır. 12.kuyuya ise sadece 100 µL saf steril su aktarımı yapılmıştır. 96 kuyulu plate üzerine 0.5 Mcfarland bulanıklığa göre ayarlanmış ve çift kuvvetli MHB' içerisinde hazırlanan bakteri kültürlerinden alınmış 12 kuyunun her birine 100 µL aktarımı gerçekleştirilmiştir.

gerçekleştirilmiştir. Çalkalamalı etüvde (150 rpm) devirde 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrası oluşan kültürler çift kuvvetli MHB ‘a alınmış ve 108 kob/mL (0.5 McFarland Bulanıklık değerine karşılık gelen bulanıklık) olacak şekilde kültürler hazırlanmıştır. Sonraki aşamada ise Minimum İnhibasyon konsatrasyonunun belirlenmesinde aşamasında hazırlanan mikro seyreltme yöntemi ile hazırlanan dilüsyonun aynısı hazırlanmıştır. 96 kuyulu plate üzerine aktarımı yapılmıştır. Kör olarak 12. Kuyucuklara sadece saf steril su eklenmiştir. 96 kuyulu plate üzerine 0.5 Mcfarland bulanıklığa göre ayarlanmış ve çift kuvvetli MHB’ içerisinde hazırlanan bakteri kültürlerinden alınmış 12 kuyunun her birine 100 µL aktarımı gerçekleştirilmiştir. Plate’ler içerisine bakteri kültürlerinin aktarımı sonrasında hazırlanan 96 kuyulu plate’ler 37 °C’de 20-24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonrasında her kuyunun içeriği çıkarılmıştır. Gevşek bağlı hücreleri ve yapışkan olmayan hücreleri çıkarmak için üç kez steril distile su ile durulanmıştır. 15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Bu adım geri kazanılan kuyuları kristal mor (% 1) ile boyayarak doğrulanmıştır. Çukurlar, 200 µL % 1 kristal mor ile boyanmış ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kuyular daha sonra emilmemiş lekeleri çıkarmak için steril saf su ile üç kez durulanmıştır. Sonrasında Kuyular 150 µL etanol eklenerek kurutulmuştur. Son olarak ise %33’lük asetik asit hazırlanmış ve her bir kuyuya 200 µL eklenmiştir. En son olarak ise ELISA 490 devirde plateler ölçülmüş ve sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

3.1.1. Diskdifüzyon yöntemi

Ylang-ylang (*Cananga odorata*), Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), Bergamot (*Citrus bergamia*) ve Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakteri kültürleri üzerinde belirlenmiştir. 20 mL Mueller Hinton agar besiyeri içerisinde bitkisel uçucu yağların bakteri kültürleri üzerinde oluşturduğu aktiviteye bağlı olarak gözlemlenen inhibisyon zon çaplarına bakıldığında, yağların antimikrobiyal etkisi ile doğru orantılı olduğu görülmüştür.

Ylang Ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde farkı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olarak farklı antimikrobiyal etki yapmıştır (Tablo 3.1)(Şekil 1.13).

Tablo 3. 1. Disk Difüzyon Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (*Cananga odorata*), 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*), 3. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), 5. Bergamot (*Citrus bergamia*), 6. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), ve Chloromphenicol test bakterileri (*S. aureus*, *E. coli* ATCC 35200 ve *E. coli* ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları ($\mu\text{L/mm}$)

Test Bakterileri			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (35200)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)
Uçucu Yağlar	1	5 μL	10.1 mm	10.02mm	10.02 mm
		10 μL	10.2 mm	10.1 mm	10.2 mm
	2	5 μL	10.4mm	10.2mm	10.2mm
		10 μL	10.8mm	10.4mm	10.4mm
	3	5 μL	10.2mm	10.2mm	10.02mm
		10 μL	10.6 mm	10.4mm	10.04mm
	4	5 μL	0.05mm	0.05mm	0.01mm
		10 μL	0.1mm	0.1mm	0.02mm
	5	5 μL	10.1mm	10.02mm	10.02mm
		10 μL	10.2mm	10.04mm	10.04mm
	6	5 μL	10.02mm	10.02mm	10.02mm
		10 μL	10.04mm	10.04mm	10.04mm
	Chloromphenicol	5 μL	10.1mm	10.6mm	10.4mm
		10 μL	10.2mm	11mm	11mm

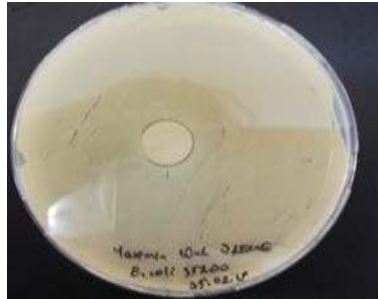
Ylang ylang (*Cananga odorata*) bitkisel uçucu yağı en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri straini ve *Escherichia coli* ATCC (35200) üzerinde 10 μ L'lik aktarım sonucunda göstermiştir (10.2 mm) (Tablo 3.1)(Şekil 1.13).



Şekil 3. 1. Ylang ylang (*Cananga odorata*) bitkisel uçucu yağının (10 μ L) *Escherichia coli* ATCC (35200) bakteri straini üzerine etkisi.

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde farkı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olarak farklı antimikrobiyal etki yapmıştır ve en yüksek antimikrobiyal etki gösteren yağlardan birini oluşturmaktadır (Tablo 3.1)(Şekil 1.14).

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri kültürleri üzerinde 5 μ L ve 10 μ L'lik aktarımlarda aynı ölçüde inhibisyon zonları gözlemlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) straininde ise en yüksek inhibisyon zonlarının gözlemlenmiştir (Tablo 3.1) (Şekil 1.14).



Şekil 3. 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) bitkisel uçucu yağının (10 μ L) *Escherichia coli* ATCC (35200), (10 μ L) *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) üzerine etkisi.

Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde farkı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olarak farklı antimikrobiyal etki yapmıştır (Tablo 3.1)(Şekil 1.15).

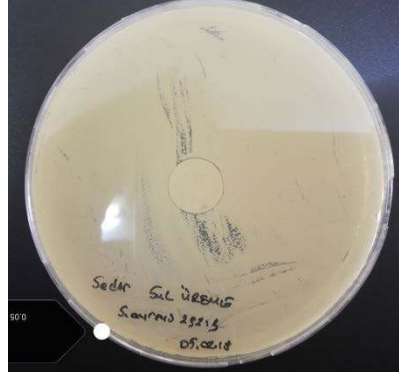
Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağı en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri straininde göstermiştir. (10.6 mm) 5 uL'lik aktarımda *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterileri üzerinde aynı ölçüde etki oluşmuştur.(10.2 mm) en düşük antimikrobiyal etki ise *Escherichia coli* ATCC (25922) straininde gözlemlenmiştir (10.02 mm ve 10.04 mm)(Tablo 3.1).



Şekil 3. 3. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) bitkisel uçucu yağının *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) üzerine 10 µL'de ve 5 µL'de etkisi.

Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde benzer inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.1)

Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterilerinde 5 µL'de aynı inhibisyon zonunu oluşturmuştur. (10.1 mm) 10 µL'lik aktarımda ise en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 10.2 mm ile *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) gösterirken en düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri straininde göstermiştir.(Tablo 3.1)



Şekil 3. 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi üzerine 5 μ L’de etkisi.

Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağı, *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi üzerinde farklı inhibisyon zonlarının oluştuğu gözlemlenirken, diğer iki bakteri kültürleri olan *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Escherichia coli* ATCC (35200) bakteri strainleri üzerinde aynı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.1)



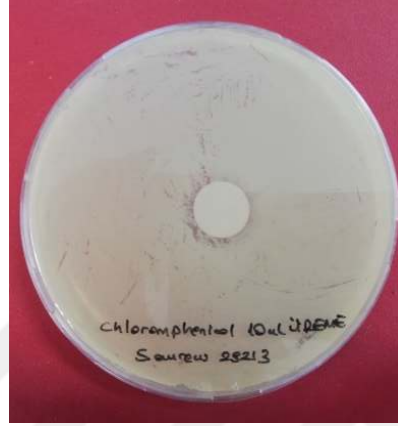
Şekil 3. 5. Bergamot (*Citrus bergamia*) *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi üzerine 10 μ L’de etkisi.

Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağı en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültüründe göstermiştir. 10 μ L’lik aktarımda 10.2 mm inhibisyon zonu oluşumuna neden olmuştur. (Tablo 3.1)

Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde aynı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.1)(Şekil 1.16)Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağının 5 μ L ve 10 μ L’lik

aktarımlarının üç bakteri kültürü üzerinde de antimikrobiyal etkisi aynı olmuş ve aynı inhibisyon zonlarının oluşumu gözlemlenmiştir.

Chloromphenicol antibiyotiği *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde farklı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olarak farklı antimikrobiyal etki yapmıştır (Tablo 3.1).



Şekil 3. 6. Chloromphenicol antibiyotiği *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi üzerine 10 µL’de etkisi.

Chloromphenicol antibiyotiği agar difüzyon testinde pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 10 µL’lik aktarımda *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) kültürleri üzerinde göstermiştir. (11 mm) En düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) 5 µL’lik aktarımda göstermiştir (10.1 mm)(Tablo 3.1).

3.1.2.Disk buharlaşma yöntemi

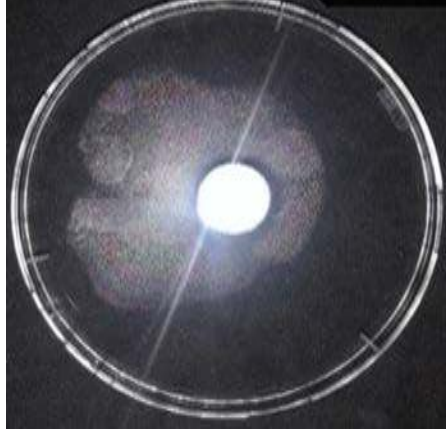
Ylang-ylang (*Cananga odorata*), Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), Bergamot (*Citrus bergamia*), ve Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakteri kültürleri üzerinde belirlenmiş ve elde edilen verilen sayısal veriler halinde tabloya dökülmüştür. 20 mL Mueller Hinton agar besiyeri içerisinde bitkisel uçucu yağların bakteri kültürlerinin solunumları üzerinde oluşturduğu aktiviteye bağlı olarak gözlemlenen inhibisyon zon çapları, yağların antimikrobiyal etkisi ile doğru orantılıdır.

Ylang Ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri solunumları üzerinde farkı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.2)(Şekil 1.20)

Tablo 3. 2. Disk Buhar Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (*Cananga odorata*), 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*), 3. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), 5. Bergamot (*Citrus bergamia*), 6. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), ve Chloromphenicol test bakterileri (*S. aureus*, *E. coli* ATCC 35200 ve *E. coli* ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (µL/mm)

Test Bakterileri			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (35200)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)
Uçucu Yağlar	1	5µL	10.2 mm	10.2 mm	10.02 mm
		10µL	11 mm	10.4 mm	10.04 mm
	2	5µL	10.02 mm	10.4 mm	10.02 mm
		10µL	10.1 mm	10.8 mm	10.04 mm
	3	5µL	10.2 mm	10.1 mm	10.4 mm
		10µL	10.6 mm	10.2 mm	11 mm
	4	5µL	10.1 mm	10.1 mm	10.04 mm
		10µL	10.2 mm	10.02 mm	10.02 mm
	5	5µL	10.1 mm	10.04 mm	10.04 mm
		10µL	10.4 mm	10.04 mm	10.04 mm
	6	5µL	10.4 mm	10.2 mm	10.2 mm
		10µL	11 mm	10.6 mm	10.6 mm
	Chloromphenicol	5µL	10.2mm	10.2mm	10.02mm
		10µL	10.6mm	10.6mm	10.4mm

Ylang Ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerinde 5 µL'lik aktarımda solunumları üzerinde aynı etkiyi göstermiş ve 10.2 mm'lik inhibisyon zonunun oluşumuna neden olmuştur. En yüksek antimikrobiyal etkiyi ise *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültüründe 10 µL'lik aktarımda 11 mm'lik inhibisyon zonunun oluşumuyla göstermiştir. (Tablo 3.2)



Şekil 3. 7. *Ylang Ylang* (*Cananga odorata*) uçucu yağının *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültüründe 10 μ L petri kapağında oluşan inhibisyon zonu

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri solunumları üzerinde farkı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olarak farklı antimikrobiyal etki yapmıştır. (Tablo 3.2)(Şekil 1.17)

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Escherichia coli* ATCC (35200) bakteri ültürü üzerinde göstermiştir. 5 μ L'lik aktarımda 10.4 mm ve 10 μ L'lik aktarımda ise 10.8 mm inhibisyon zonunun oluşmasına neden olmuştur. Ayrıca 5 μ L'lik aktarımda *Escherichiacoli*ATCC (25922) ve *Staphylococcusaureus*ATCC (29213)bakterilerinde 10.02 lik zon oluşmasına neden olmuştur.



Şekil 3. 8. *Yasemin* (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağının *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi üzerinde etkisi 10 μ L

Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri solunumları üzerinde farkı inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olarak farklı antimikrobiyal etki yapmıştır. (Tablo 3.2)(Şekil 1.18)

Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağı 5 µL'lik ve 10 µL'lik aktarımda en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri straininde göstermiştir. 5 µL'lik aktarımda en düşük aktiviteyi 10.1 mm'lik inhibisyon zonunun oluşumuyla *Escherichia coli* ATCC (35200) straininde gösterirken, 10.2 mm'lik inhibisyon zonuyla bunu *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) kültürü göstermiştir. (Tablo 3.2)



Şekil 3. 9. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağının 10 µL'lik aktarımda *Escherichia coli* ATCC (25922) kültürüne etkisi

Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC(25922) bakteri strainleri üzerinde benzer inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.2)

Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerinde aynı inhibisyon zonlarının oluşumuna neden olmuştur. 5 µL'lik aktarımda 10.1 mm ve 10 µL'lik aktarımda 10.2 mm zon oluşmuştur. (Tablo 3.2)



Şekil 3. 10. *Sedir ağacı (Cedrus atlantica)* uçucu yağının *Escherichia coli* ATCC (35200) bakterisi üzerine 10 μ L etkisi

Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağı, *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde benzer inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.2)

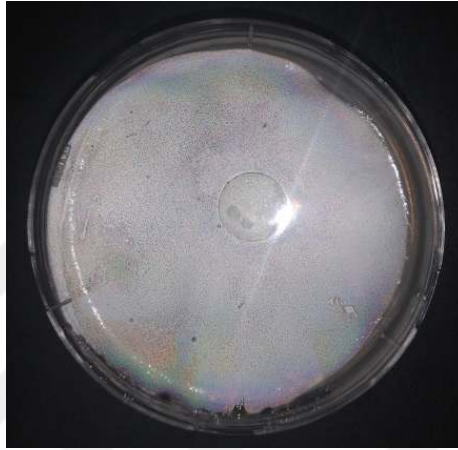
Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağı 5 μ L'lik aktarımda *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterilerinde 10.02 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak aynı etkiyi göstermiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi ise 10 μ L'lik aktarımda 10.4 mm ile *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) straininde göstermiştir (Tablo 3.2).



Şekil 3. 11. *Bergamot (Citrus bergamia)* uçucu yağının *Escherichia coli* ATCC (35200) bakterisi üzerine 10 μ L etkisi

Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde benzer inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.2)

Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri kültürleri üzerinde 5 μ L'lik ve 10 μ L'lik aktarımlarda aynı antimikrobiyal aktiviteyi göstermiş ve 5 μ L'de 10.2 mm ve 10 μ L'de 10.6 mm inhibisyon zonunun oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.2)



Şekil 3. 12. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağının *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi üzerine 10 μ L etkisi

Chloromphenicol antibiyotiği *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri strainleri üzerinde benzer inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmuştur. (Tablo 3.2)

Chloromphenicol antibiyotiği buhar difüzyon tekniğinde pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerinde aynı inhibisyon zonlarının oluşumuna neden olmuştur. 5 μ L'lik aktarımda 10.2 mm ve 10 μ L'lik aktarımda 10.6 mm inhibisyon oluşumu gözlemlenmiştir. En düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise 5 μ L'lik aktarımda 10.02 mm inhibisyon zon oluşumuyla *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisinde göstermiştir.



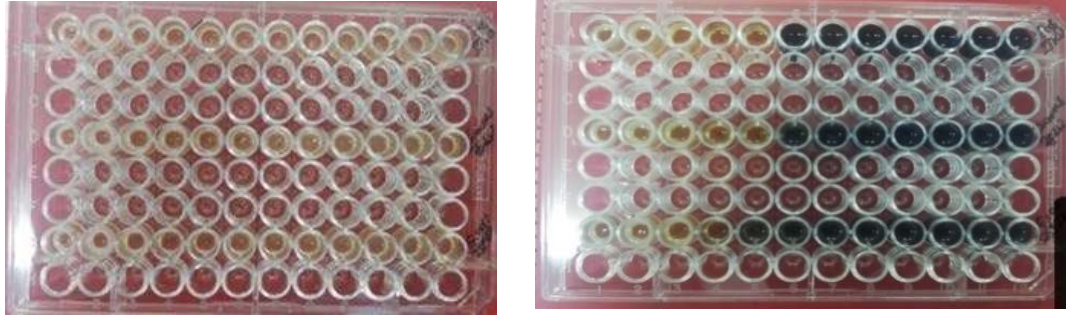
Şekil 3. 13. *Chloromphenicol* antibiyotiğinin *Escherichia coli* ATCC (35200) bakterisi üzerine 10 µL etkisi

3.1.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Ylang-ylang (*Cananga odorata*), Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), Bergamot (*Citrus bergamia*) ve Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) bitkisel uçucu yağlarından çözücü olarak DMSO kullanılarak 1:2 oranıyla hazırlanan dilüsyon serileri test mikroorganizmaları ile eşit oranda karıştırılmış ve etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda mikroorganizmaların gelişimini engelleyen yani bulanıklığın en az görüldüğü dilüsyon oranı minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Ayrıca MTT boyama yapılarak sağlaması yapılmış ve desteklenmesi sağlanmıştır.

Her bir uçucu yağ grubu *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) gram negatif ve gram pozitif test mikroorganizmalarına uygulanmış ve bütün yağların test mikroorganizmalar üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Bütün uygulama paralel çift olarak sağlamalı gerçekleştirilmiştir.

Ylang-ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerine sırayla uygulanmış ve minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 3. 14. Ylang-ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağının *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Ylang-ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağı, *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri strainleri üzerinde aynı aralıkta minimum inhibisyon konsantrasyonunu vermiştir. (50 µg /ml) *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisi üzerinde ise daha az etki göstermiştir. (100 µg/ml) Bu sonuçlara bakıldığında *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisine Ylang-ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağının *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterilerine göre daha az etkili olduğu söylenebilmektedir. (Tablo 3.3)

Tablo 3. 3. Test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (*Cananga odorata*), 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*), 3. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), 5. Bergamot (*Citrus bergamia*), 6. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), ve Chloromphenicol test bakterileri (*S. aureus*, *E. coli* ATCC 35200 ve *E. coli* ATCC 25922) üzerinde µg/ml cinsinden minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Test Bakterileri	Uçucu Yağlar						
	1	2	3	4	5	6	Chloromphenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213)	50	12.5	100	200	100	100	50
<i>Escherichia coli</i> ATCC (35200)	50	25	100	200	200	100	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)	100	25	200	200	200	100	25

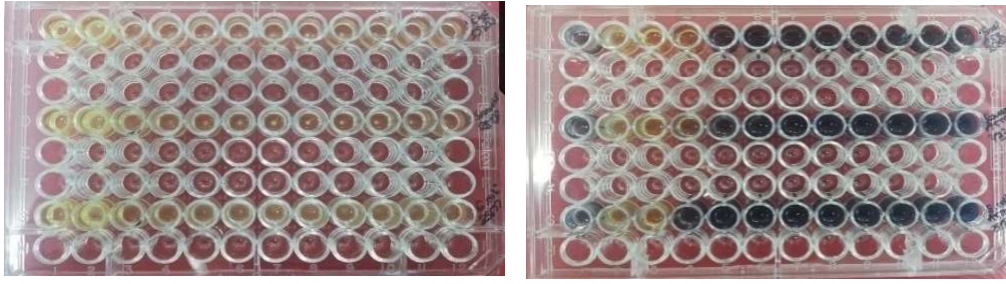
Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı test mikroorganizmaları üzerinde yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir.



Şekil 3. 15. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağının *Escherichia coli* ATCC (35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı gram pozitif bakteri kültürü olan *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) üzerinde en yüksek antimikrobiyal etkiyi göstermiştir.(12.5µg/ml) Gram negatif bakteriler olan *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterileri üzerinde daha az antimikrobiyal etki göstermiştir.(25 µg/ml) Ancak yapılan minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi çalışması göstermektedir ki test mikroorganizmaları üzerinde Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağı pozitif kontrol grubunu oluşturan Chloromphenicol antibiyotikinden daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir.(Tablo 3.3)

Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*)uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterileri üzerinde aynı minimum inhibisyon konsantrasyonunu göstermiştir. (100 µg/ml) *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisinde ise daha fazla antimikrobiyal bir etki göstermiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (200 ug/ml) değerini vermiştir.(Tablo 3.17)



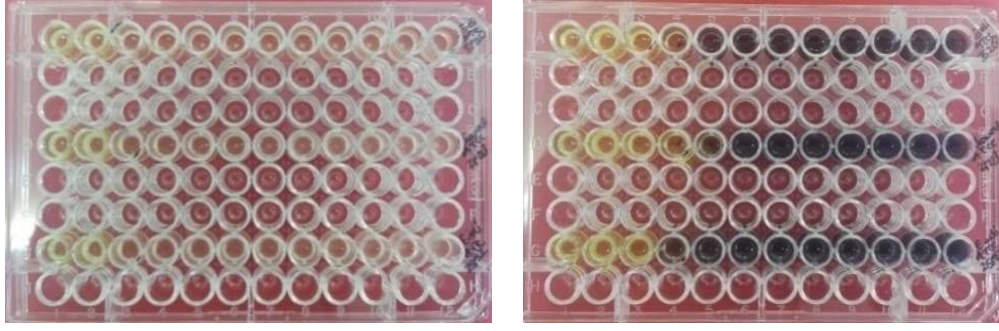
Şekil 3. 16. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağının *Esherichia coli* ATCC (35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Esherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağı *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterilerini üzerinde aynı minimum inhibisyon konsantrasyonunu göstermiştir. (200 µg/ml) (Tablo 3.3)



Şekil 3. 17. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağının *Esherichia coli* ATCC (35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Esherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağı, *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürleri üzerinde aynı minimum inhibisyon konsantrasyon değerini vermiştir. (100 µg/ml) *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisinde ise diğer iki test mikroorganizmasına göre daha düşük bir antimikrobiyal etki göstermiştir. (200 µg/ml) (Tablo 3.3)



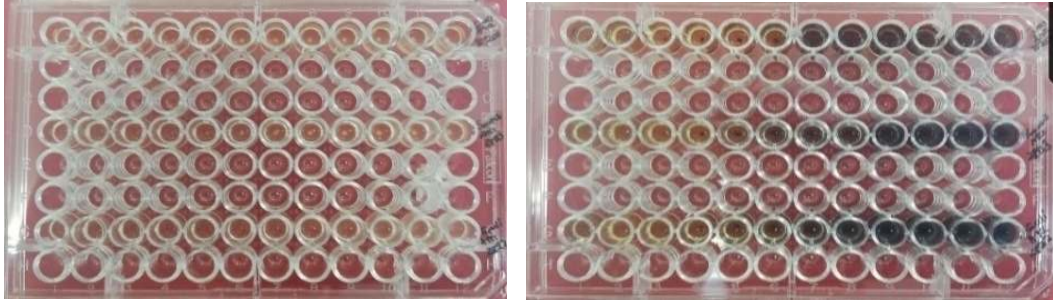
Şekil 3. 18. Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağının *Esherichia coli* ATCC(35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Esherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağı test mikroorganizmaları *Esherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterileri üzerinde aynı minimum inhibisyon konsantrasyon değerini göstermiştir.(Tablo 3.3)



Şekil 3. 19. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağının *Esherichia coli* ATCC (35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Esherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

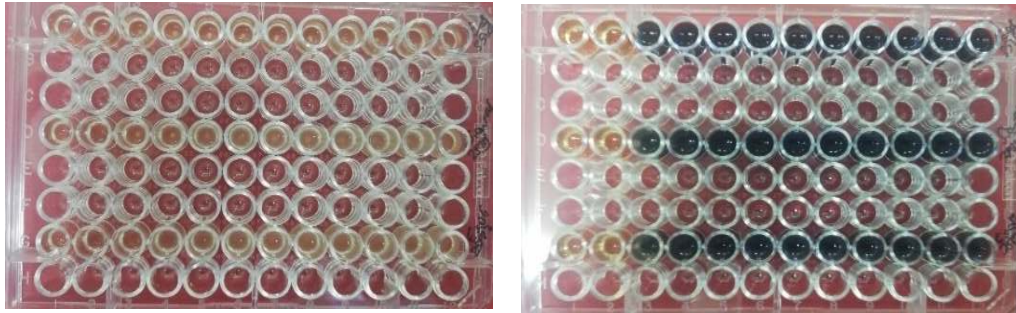
Chloromphenicol antibiyotiği minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesinde pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Gram negatif bakteriler olan *Esherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterilerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları aynı çıkmıştır.(25 µg/ml) Gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) üzerinde ise daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir.(50 µg/ml) *Staphylococcus aureus* bakterisinin MİK konsantrasyon değeri diğer test bakterilerine göre anlamlı oranda düşüktür.(Tablo 3.3)



Şekil 3. 20. *Chloromphenicol* antibiyotiği *Esherichia coli* ATCC (35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Esherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi işleminde dilüsyon hazırlanırken yağları çözmek amacıyla DMSO kullanılmıştır. DMSO nun sadece kendinin bulunduğu zamanda test mikroorganizmaları üzerinde nasıl bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu görebilmek amacıyla DMSO seyreltme tekniğiyle dilüsyon hazırlanmış ve test mikroorganizmaları ile inkübe edilerek MİK değerine bakılmıştır.

MİK değerleri göstermektedir ki yüksek konsantrasyon aralıklarında çözücü olarak kullanılan DMSO'da bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Üç test bakteri üzerinde de aynı konsantrasyon değerinde minimum inhibisyon konsantrasyonu vermiştir. (400 µg/ml) (Tablo 3.3)



Şekil 3. 21. DMSO *Esherichia coli* ATCC (35200) (a), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) (b) ve *Esherichia coli* ATCC (25922) (c) bakteri üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağı ve Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) uçucu yağı ile minimum inhibisyon konsantrasyon değerini belirlemek amacıyla hazırlanan 96 kuyulu platelerde saf yağ eklenen 1. Kuyularda bakteri üremesi gözlemlenirken DMSO ile çözülüp dilüsyona devam edilen 400 ve 200 (µg/ml) konsantrasyonlarda bakteri gelişimi ve üremesinin gözlemlenmediği görülmüştür. Buradan da anlaşılabacağı üzere Sandal ve Sedir uçucu yağları DMSO olmadan test bakterileri üzerinde etkin

antimikrobiyal etkiye sahip değilken DMSO ile birlikte bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olabilmektedir.

3.1.4. Biyofilm inhibisyonunun saptanması – ilk aşamadaki bakteri yapışması

Kullanılan uçucu yağları test mikroorganizmaları *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) üzerindeki antibiyofilm aktivitelerini gözlemek amacıyla spektrofotometre ölçümü yapılmış ve ELİSA plaka okuyucuda okutulmuştur. Spektrofotometre ölçümü öncesi mikro seyreltme yöntemi ile bitkisel uçucu yağlardan dilüsyon hazırlanmış ve 96 kuyulu plate üzerine 100 µL pipetlenmiştir. Üzerine çift kuvvetli MHB içerisinde bulanıklığı 0.5 McFarland'a ayarlanmış bakteri strainleri eklenmiş ve 20-24 saat 37 °C ayarlı etüvde inkübe edilmiştir. Sonrasında yıkama, gram boyama, etanolle kurutma ve 200 µL asetik asit eklenmesinden sonra plaka okunmaya hazır hale gelmiştir.

Kör olarak 12.kuyularda bulunan saf su ve bakteri karışımları karşılaştırma ve kıyaslamada kullanılmıştır.

Tablo 3. 4. Ylang-ylang (*Cananga odorata*) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>) µg/ml	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
	0.647	0.903	0.887
	0.543	0.894	0.764
	0.323	0.422	0.294
	0.117	0.349	0.286
	0.070	0.212	0.267
	0.072	0.158	0.210
	0.098	0.075	0.179
	0.097	0.081	0.137
	0.057	0.034	0.124
	0.054	0.023	0.097
	0.022	0.021	0.038
	0.002	0.002	0.041

Spektrofometre ölçüm sonuçlarına bakıldığında görülmektedir ki test mikroorganizmalarında *Escherichia coli* ATCC (35200) minimum inhibisyon konsantrasyonunu dilüsyonun 50 (µg/ml) konsantrasyonunda verirken biyofilm oluşturma konsantrasyonu da 50 (µg/ml) konsantrasyonda vermiştir. Tabloda da görülmektedir ki 50 (µg/ml) konsantrasyondan 12.kuyuya kadar kuyularda biyofilm oluşumu gözlemlenmektedir. (100-200-400)(µg/ml) konsantrasyonlarda ise biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir (Tablo 3.4).

Escherichia coli ATCC (25922) bakteri kültürü ise minimum inhibisyon konsantrasyonunu 50 µg/ml olarak vermiş ve anti yapışma testinde de 50 µg/ml de biyofilm oluşumu gözlemlenmeye başlamıştır. 50-25-12,58-6,25-3,125-1,156-0,781 (ug/ml) konsantrasyonlardabiyofilm oluşumu gözlenirken 100-200-400 (µg/ml) konsantrasyonda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 3.4).

Staphylococcus aureus ATCC (29213) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu 100 µg/ml'dir Sonuçlarına bakıldığında bu bakteri straini dilüsyon konsantrasyonunun 25 µg/ml olduğu 0.210 değerinden itibaren biyofilm oluşumunun olduğu gözlemlenmiştir. Ancak 0.294-0.286-0.267-0.210 değerleri birbirlerine çok yakın değerler olduğundan 0.041'lik köre göre kıyasladığımızda bazı bakteri yapışmalarının varlığından da bahsedilebilmektedir (Tablo 3.4).

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) bitkisel uçucu yağı test mikroorganizmaları olan *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213)bakteri kültürlerine uygulanmıştır. Ölçüm sonucu çıkan değerler tablo haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 5. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) µg/ml	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
	0.865	0.650	0.774
	1.079	1.420	0.929
	0.219	0.770	0.321
	0.118	0.670	0.082
	0.076	0.065	0.072
	0.032	0.039	0.064
	0.029	0.036	0.062
	0.015	0.004	0.042
	0.005	0.018	0.029
	0.011	0.007	0.032
	0.002	0.012	0.028
	0.001	0.009	0.022



Şekil 3. 22. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağının (a) ve Chloromphenicol antibiyotiğinin (b) test mikroorganizmaları üzerine konsantrasyonu

Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) bitkisel uçucu yağının *Escherichia coli* ATCC (35200) bakterisi üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 25 (µg/ml)'dir. Bu konsantrasyon aralığı 96 kuyulu plate içerisinde 625 (µg/ml) konsantrasyona denk gelmektedir. Spektrofotometre ölçüm sonuçları göstermektedir ki 0.076 değerine denk gelen 50 (µg/ml) konsantrasyondan itibaren bakteri yapışması gözlemlenmiştir. 50-25-12,5-6,25-3,125-1,156-0,781 (µg/ml) konsantrasyonlarda biyofilm oluşumu gözlemlenir (0.865, 1.079, 0.219 ve 0.118) değerlerinin okunduğu 400-200-100 (µg/ml) konsantrasyonlarda biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir (Tablo 3.5).

Escherichia coli ATCC (25922) bakteri straini ise minimum inhibisyon konsantrasyonu (12.5 µg/ml)'dir. Bu konsantrasyon aralığı 96 kuyulu plate'de 12.58

(µg/ml) konsantrasyona denk gelmektedir. Sonuçlara bakıldığında ise 96 kuyulu plate içerisinde bu bakteri türü 50 (µg/ul) konsantrasyondan 12. Kuyuya kadar biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir (Tablo 3.5).

Staphylococcus aureus ATCC (29213) bakteri straini minimum inhibisyon konsantrasyonu 25 (µg/ml)'dir. Bu konsantrasyon oranı 96 kuyulu plate içerisinde 25 (µg/ml)'ye denk gelmektedir. Sonuçlara bakıldığında ise görülmektedir ki (100 µg/ml) konsantrasyondan itibaren bakteri yapışmaları gözlemlenmiştir (Tablo 3.5).

Pozitif kontrol grubu Chloromphenicol antibiyotiği ile kıyaslandığında *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri straini Chloromphenicol kullanıldığında 25 (µg/ml) konsantrasyonda biyofilm oluşumu engellenirken bu değer Yasemin yağında (12.5µg/ml) konsantrasyon değeri ile daha iyi sonuç göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC (35200) bakteri straini üzerinde Chloromphenicol ile aynı konsantrasyonda 25 (µg/ml) antibiyofilm etkisi göstermiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri straininde ise 25 (µg/ml) konsantrasyonda bakteri yapışması gözlenmeye başlamışken bu değer Chloromphenicol'de 50 (µg/ml)'dir. Bu sonuçlar göstermektedir ki *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri strainleri üzerinde Yasemin yağı Chloromphenicol'den daha güzel sonuçlar vermiştir.

Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) bitkisel uçucu yağı test mikroorganizmaları olan *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerine uygulanmıştır. Ölçüm sonucu çıkan değerler tablo haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 6. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

Yasemin (<i>Jasminum nudiflorum</i>) µg/ml	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
	0.582	1.086	0.520
	1.354	1.034	1.407
	0.698	0.016	0.766
	0.041	0.014	0.006
	0.044	0.010	0.001
	0.050	0.007	0.001
	0.052	0.006	0.004
	0.051	0.009	0.009
	0.051	0.009	0.010

Escherichia coli ATCC (35200) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (µg/ul)'dir. Bu konsantrasyon değeri 96 kuyulu plate üzerinde 100 (µg/ml)'ye denk gelmektedir. Ölçüm değerlerine bakıldığında ise 0.0041 değeri ile biyofilm oluşumu 100 (µg/ml)'den başladığı söylenebilmektedir (Tablo 3.6).

Escherichia coli ATCC (25922) bakterisinin ise minimum inhibisyon konsantrasyonu 200 (µg/ml) konsantrasyona denk gelmektedir. Sonuçlara bakıldığında ise bakterinin 100 (µg/ml)'den itibaren biyofilm oluşumu gözlemlendiği söylenebilmektedir (Tablo 3.6).

Staphylococcus aureus ATCC (29213) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (µg/ml)'dir. Bu konsantrasyon değeri 96 kuyulu plate üzerinde 100 (µg/ml)'ye denk gelmektedir. Sonuçlara bakıldığında ise bu bakteri kültürü 100 (µg/ml)'den itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.6).

Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) bitkisel uçucu yağ test mikroorganizmaları olan *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerine uygulanmış ve ELİSA ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonucu çıkan değerler tablo haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 7. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

Sedir ağacı (<i>Cedrus atlantica</i>) µg/ml	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
	1.474	1.086	0.772
	0.774	1.034	0.740
	0.081	0.004	0.021
	0.039	0.005	0.014
	0.023	0.009	0.013
	0.036	0.007	0.011
	0.041	0.008	0.001
	0.042	0.009	0.003
	0.040	0.005	0.006
	0.050	0.005	0.003
	0.032	0.003	0.032
	0.056	0.001	0.001

Escherichia coli ATCC (35200) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 200 (μg/ul)'dir. Sonuçlara bakıldığında görülmektedir ki 0.081 değeri ile bu bakteri kültürü 200 (μg/ml) konsantrasyondan itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.7).

Escherichia coli ATCC (25922) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 200 (μg/ul)'dir. Okuma sonucu olan 0.021 değeri ile örtüşmektedir. *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisi 200 (ug/ml)'den itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.7).

Staphylococcus aureus ATCC (29213) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 200 (μg/ul)'dir. Ölçüm sonucun da göstermektedir ki bu bakteri 0.021 değeri ile 200 (μg/ml)'den itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.7).

Bergamot (*Citrus bergamia*) bitkisel uçucu yağı test mikroorganizmaları olan *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerine uygulanmıştır. Ölçüm sonucu çıkan değerler tablo haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 8. Bergamot (*Citrus bergamia*) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>) μg/ml	1.575	1.667	0.933
	1.420	1.499	0.872
	0.555	0.699	0.118
	0.192	0.096	0.116
	0.044	0.016	0.085
	0.004	0.019	0.117
	0.010	0.011	0.075
	0.017	0.008	0.099
	0.019	0.006	0.071
	0.018	0.005	0.096
	0.010	0.002	0.098
	0.009	0.001	0.091

Escherichia coli ATCC (35200) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (μg/ul)'dir. Ölçüm sonuçlarına görede 0.192'lik değer ile 100 (μg/ml)'ye denk gelmiştir (Tablo 3.8).

Escherichia coli ATCC (25922) bakteri straininin minimum inhibisyon değeri 200 (µg/ml)'dir. Sonuç değerlerine göre ise bu bakteri kültürü 0.118'lik değer ile 200 (µg/ml)'den itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.8).

Staphylococcus aureus ATCC (29213) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (µg/ml)'dir. Ölçüm sonuç değerlerinde ise *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterisi 0.118 değeri ile 200 (µg/ml)'den itibaren biyofilm yapısı oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.8).

Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) bitkisel uçucu yağı test mikroorganizmaları olan *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerine uygulanmıştır. Ölçüm sonucu çıkan değerler tablo haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 9. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) bitkisel uçucu yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
Günlük ağacı (<i>Liquidambar orientalis</i>) µg/ml	1.887	1.970	1.806
	1.528	1.921	1.216
	0.032	0.026	0.141
	0.035	0.021	0.077
	0.022	0.015	0.086
	0.037	0.016	0.032
	0.046	0.018	0.025
	0.050	0.005	0.028
	0.047	0.006	0.012
	0.056	0.008	0.007
	0.054	0.006	0.006
	0.054	0.002	0.005

Escherichia coli ATCC (35200) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (µg/ul)'dir. Ölçüm sonuçlarına bakıldığında bu bakteri kültürü 0.0032'lik değer ile 200 (µg/ml)'den itibaren biyofilm oluşturabildiği söylenebilmektedir (Tablo 3.9).

Escherichia coli ATCC (25922) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (μg/ul)'dir. Sonuçlara göre bu bakteri kültürü 200 (μg/ml)'den itibaren bakteri yapışması gözlemlenmiş yani biyofilm oluşturmuştur (Tablo 3.9).

Staphylococcus aureus ATCC (29213) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 100 (μg/ul)'dir. Sonuçlara göre *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri straini 100 (μg/ml) konsantrasyondan itibaren biyofilm oluşturmuştur (Tablo 3.9).

Chloromphenicol antibiyotiği test mikroorganizmaları olan *Escherichia coli* ATCC (35200), *Escherichia coli* ATCC (25922) ve *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri kültürlerine uygulanmış ve ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucu çıkan değerler tablo haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 10. Chloromphenicol antibiyotiği yağının test mikroorganizmaları üzerinde bakteri yapışma etkisi sonuçları

	<i>Escherichia coli</i> (35200)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
Chloromphenicol antibiyotiği μg/ml	0.477	0.576	0.430
	0.458	0.522	0.450
	0.422	0.478	0.448
	0.399	0.452	0.420
	0.352	0.398	0.378
	0.035	0.037	0.067
	0.034	0.028	0.065
	0.029	0.022	0.056
	0.012	0.018	0.024
	0.009	0.017	0.020
	0.007	0.011	0.012
	0.002	0.009	0.010

Escherichia coli ATCC (35200) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu 25 (μg/ul)'dir. Spektrofotometre sonuçlarına bakıldığından *Escherichia coli* ATCC (35200) bakterisinin 0.035'lik değer ile 25 (μg/ml) konsantrasyondan itibaren biyofilm oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir (Tablo 3.10).

Escherichia coli ATCC (25922) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu 25 ($\mu\text{g}/\text{ul}$)’dir. Ölçüm sonucuna göre 0.037’lik değer ile *Echerichia coli* ATCC (25922) bakterisi MİK değerinden itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır. (Tablo 3.10)

Staphyloccocus aureus ATCC (29213) bakterisinin minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 50 ($\mu\text{g}/\text{ul}$)’dir. Ölçüm sonuçlarına bakıldığında görülmektedir ki *Staphyloccocus aureus* ATCC (29213) bakterisi 0.067’lik değer ile 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)’den itibaren biyofilm oluşturmaya başlamıştır (Tablo 3.10).



4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki yağları ve ekstratları binlerce yıldır çok çeşitli amaçlar için kullanılmışlardır. Bunlara gülağacı ve sedir ağacı yağının iç malzemelerin kullanımında, rezene, ardıç meyvesi gibi yağların tatlandırıcı içeceklerde ve depolanmış gıda mahsullerinin korunması için limonotu yağının uygulanması şeklinde örnekler verilebilir. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar çok yönlü antimikrobiyal bileşenlere sahip olduğundan gıda muhafazasında koruyucu doğal ajan olma potansiyeline sahiptirler (Conner, 1993). Uçucu yağları oluşturan saf halde bulunan fenolik bileşikler antibakteriyal ve antifungal aktivite göstermektedir (Karapınar ve Aktuğ, 1987). Özellikle antimikrobiyal aktivite sayesinde ham ve işlenmiş gıda muhafazası, farmasötik ilaçlar, alternatif tıp ve doğal tedaviler dâhil olmak üzere birçok uygulamanın temelini oluşturmuşlardır (Smid vd.,1996). Bu ve benzeri bileşenlerin antimikrobiyal özellikleri lipofilik karakterleriyle ilişkilidir ve hücre membranlarında birikerek enerji üretimini engellerler (Oosterhaven vd., 1996). Uçucu yağlar ve bileşenleri gram negatif bakteriler öncelikli olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler (Deans ve Ritchie1987).

Gram negatif bakterilerin tümü dış zara sahiptirler ve lipopolisakkarit (LPS) varlığına bağlı olarak bakteriye hidrofilik bir yüzey sağlarlar. Küçük hidrofilik çözünen maddeler hücre zarını porinler aracılığıyla geçebilmektedir. Hücre zarı burada penetrasyon bariyeri görevini görür ve hidrofiliktransmembran kanalları sağlayan proteinler makromolekülleri ve hidrofobik bileşenleri geçirmezler. Bu nedenle gram negatif bakteriler hidrofobik antibiyotiklere karşı nispeten daha dirençlidir. (Hammer vd.,1999) Ülkemizde üriner sistem enfeksiyonlarında en sık izole edilen etken ise *Escherichiacoli*'dir.

Antibiyotiğe karşı dirençli gram pozitif bakterilerin ise neden olduğu nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının yüzdesi her geçen gün artmaktadır. Özellikle metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* endişe vericidir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yoğun bakımda yatan hastalardaki enfeksiyonların %60'ı *Staphylococcus aureus*kaynaklıdır. Hastane kaynaklı *Staphylococcus aureus* salgınları tipik olarak hastadan hastaya transfer edilen ve sıklıkla sağlık personeli kullanarak aracı olarak klonal yayılmanın bir sonucudur. Vankomisin bu bakteri türünden kaynaklı enfeksiyonlar için standart tedavidir. Ancak son zamanlarda dirençli *Staphylococcus aureus* vaka sayıları artmaya devam etmektedir (Butaye vd., 2003).

Bakterilerdeki bu antibiyotik dirençliliğinin birinci etkeni biyofilm oluşumudur. Biyofilmler yapıları itibariyle farklı mikroorganizmaların bir arada daha dayanıklı bir şekilde yaşamlarını devam ettirmelerine olanak sağlamaktadır. Birçok türde biyofilmler anyonik yapıdadır ve essansiyel mineral ve besin maddelerinin yoğun olduğu ortamlarda, etraflarından yakalanarak yoğunlaştırılmasını sağlayan bir sistem geliştirerek yaşamlarını sürdürmektedir. Bakteriler biyofilm oluştukları sırada üç boyutlu bir çekim gücü oluştururlar. Bir araya geldikten sonra çevreleri sarılarak daha dayanıklı ve korunaklı hale gelmeleri sağlanır. Bakteriler primer adhezyon ile yüzeye tutunurlar. Bu yapı birçok fizikokimyasal değişkenin yer aldığı geri dönüşümlü ve gevşek bir bağlanmadır. Bakteri uygun inert yüzeyi yakaladığında öncelikle primer adhezyon ile geri dönüşümlü bir tutunma gerçekleştirir. Bu tutunmanın gerçekleşebilmesi için bakterinin yüzeye yeteri kadar yaklaşmış olması gerekmektedir (1 nm). Sonraki aşamada adhezyon her iki yüzeyin itme çekme gücüne bağlı olarak gelişir. Bağlanma sırasında elektrostatik, hidrofobik ilişki, van der Waals gücü, ısı ve hidrodinamik güç önemlidir. Ancak primer adhezyon sırasında en önemli faktör bakteriler ve yüzey arasında oluşan hidrofobik ilişkidir. Sekonder adhezyon ise bakteri yüzeyindeki pili, fibriller ve fimbria gibi ligadlarınökaryot hücrelerdeki oluşan geri dönüşümsüz bağlanmadır. Bakterilerin popülasyonlarını arttırmaları bu aşamadan sonra gerçekleşir. Biyofilm ile alakalı birçok çalışma gerçekleşmesine karşın halen daha biyofilmlerin insan vücudunda hangi mekanizmalar ile hastalığa yol açtığı tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak özellikle tıp alanında hastane enfeksiyonları medikal cihazlar, implantlar, üzerinden kopan hücre yada hücre gruplarının kanda veya üriner sistemde enfeksiyonlar oluşturma, bağışıklık sistemi hücrelerine karşı direnç gösterme, biyofilm yapısı oluşturarak antimikrobiyal maddelere karşı direnç gösterme olarak sayılabilir (Costerton vd., 1994).

Mevcut antibiyotiklere karşı dirençli olan patojenik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların nasıl tedavi edileceği ülkemizin ve dünyanın karşı karşıya kaldığı en önemli konulardan biridir. Çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizma sayısının her geçen gün artması endişe vericidir. Patojenik mikroorganizmalara karşı savaşta yeni ve alternatif tedavi yöntemlerinin bulunması çok büyük önem taşımaktadır. Alternatif tedavi ve önlemeye yönelik yeni bir yaklaşım ise bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal uçucu yağlardır. Uçucu yağlar mikroorganizmalar üzerlerinde gösterdikleri antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleriyle sadece tedavi yöntemi olarak değil zirai ürünlerin korunması,

içme suları, gıda ürünlerinin bozulmalarını engellemek gibi birçok alanda da aktif olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir.

Son yirmi yılda, çoklu ilaca dirençli patojenlerin ve ayırt edici olmayan antibiyotik kullanımına bağlı olarak duyarlılığı azalmış strainlerin ortaya çıkması, mevcut birçok antibiyotiğin klinik etkinliği tehlikeye girdiğinden, küresel bir endişe haline gelmiştir (Ahmad ve Beg, 2001). Sonuç olarak, ilaca dirençli patojenin neden olduğu enfeksiyonların tedavisikarmaşıkve önemli ölçüde artmış,morbidite ve mortalite için daha büyük risklere yol açmıştır (Dahiya ve Purkayastha, 2012).Bu konu, bilim insanlarının, antimikrobiyal aktivitelere sahip fitokimyasallara sahip olduğu bildirilen uçucu yağlar veya aromatik bitkilerden elde edilen özütler dahil olmak üzere çeşitli tıbbi bitki kaynaklarından gelen yeni antimikrobiyal maddeleri taramasını gereklilikmaktadır.

Çalışmamızda, Ylang-ylang (*Canangaodorata*), Yasemin (*Jasminumnudiflorum*), Sandal ağacı (*Arbutusandrachne*), Sedir ağacı (*Cedrusatlantica*), Bergamot (*Citrusbergamia*), Günlük ağacı (*Liquidambarorientalis*) uçucu yağları ticari formda elde edilmiş ve gram negatif *Esheria coli* ATCC (35200), *Esheria coli* ATCC (25922) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri strainleri üzerinde etkileri etkileri araştırılmıştır. Çalışmada tamamen bitkisel kaynaklı olan uçucu yağların bakteriler üzerinde biyofilm oluşumunu hangi konsantrasyon aralığında engellediği, üremeleri ve solunumları üzerindeki olumlu veya olumsuz etkilerinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

Rahman vd.,(2005) yılında ylang-ylang bitkisi ile yaptığı çalışmada bu bitki ekstraktının antimikromiyal aktivitesini belirlemişlerdir. Bunun için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Test organizması olarak 5gram pozitif, 9 gram negatif bakteri ile 4fungus seçilmiştir. Antimikrobiyal test için her boş diske 200 µg uçucu yağ eklenmiştir ve uygun koşullar ve sürede inkübe edilerek zon çapları ölçülmüştür. *Escherichia coli* için inhibisyon zon çapını 12 mm olarak ölçmüşlerdir.

Chao vd.,(2008) yılında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*üzerinde kendi ekstraksiyonları olan 64 uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesini çalışmışlardır. Bizim çalışmamızda kullandığımız 6 yağdan 4 tanesi bu çalışmada kullanılmıştır. Bu 4 yağın zon çapları 12 mm ile 40 mm arasında değişmektedir. Bu değerlerin bizim çalışmamızdan çok yüksek çıkmasının sebepleri; yağları kendilerinin elde etmiş olması, bitkilerin farklı yerlerden toplanmış olması veya konsantrasyon farklılığı olabilir.

Ali vd., 2017 yılında yaptığı çalışmada yasemin bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal etkisini 12 gram negatif ve 22 gram pozitif bakteri üzerinde denemişlerdir. Bu çalışmada

agarkuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak 10 µl konsantrasyonlatest etmişlerdir. Çalışmalarına *Staphylococcusaureus* üzerinde bir etki saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda ise yasemin bitkisi yağı 10 µl konsantrasyonda *Staphylococcusaureus* üzerinde 10.2 mm çap ile inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Faleiro vd.,(2003) yılında Portekiz’e endemik olan *Thymus* türlerinin temel uçucu yağlarının *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. ve *Staphylococcus aureus* strainlerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini disk agar difüzyon metodu ile test etmişlerdir. Çalışma sonucunda en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi mastichina yağı *Escherichia coli*’ye karşı göstermiştir (5.3 mm). *L. monocytogenes* ve *Candida albicans* üzerinde de yüksek aktiviteyi (5.00 mm). *Staphylococcus areus* üzerinde ise düşük (1.00 mm) antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir.

İşcan ve arkadaşları tanınmış ve yaygın olarak kullanılan nane (*Mentha piperita*, *Lamiaceae*) uçucu yağlarının *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Salmonella typhimurium* (NRRL B4420), *Candida albicans*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* (NRRL B3711), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomona ssyringae*, *Aspergillus paraciticus* (NRRL 2999) strainlerini üzerindeki antimikrobiyal aktiviteyi gözlemlemişlerdir. Bunun için Mikro dilüsyon broth, agar difüzyon ve biyoutograf yöntemlerini kullanmışlardır (İşcan vd., 2002). Bizim çalışmamızda yapılan minimum inhibisyon konsantrasyonun belirlenmesi ve agar difüzyon yöntemi İşcan vd. ile aynı doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağlar DMSO ile çözülmüş ve mikro seyreltme dilüsyon yöntemi ile seyreltilmiştir. Bakteri kültürleri tek kuvvetli MHB içerisinde çoğaltılmış ve 96 kuyulu plaka üzerine aktarım yapılırken çift kuvvetli MHB besiyerine 0.5 Mcfarland bulanıklığına ayarlanarak aktarımı yapılmıştır. Sonrasında 100 µl 96 kuyulu plakada dilüsyonun üzerine eklenmiştir. Sonrasında 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İşcan vd. Nane yağının *Esherichia coli* üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değeri (12.5µg/ml) olarak tespit edilmiş ve sonuç başarılı olarak kabul edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise *Escherichia coli* ATCC (35200) straini üzerinde en düşük MİK değerini Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) yağı göstermiştir (25 µg/ml). *Escherichia coli* ATCC (25922) straininde Yasemin yağı (25 µg/ml) konsantrasyonunu gösterirken *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) straininde ise Yasemin yağı (12.5 µg/ml) minimum inhibisyon konsantrasyon değerini vermiştir. Agar difüzyon yönteminde

ise nane yağının *Escherichia coli* üzerinde inhibisyon çapı 50 µL aktarımda 5 mm gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise 5 µL ve 10 µL aktarımlar yapılmıştır. En yüksek inhibisyon zon çapını her üç test mikroorganizma üzerinde Yasemin yağı göstermiştir. Sırasıyla *Escherichia coli* strainleri üzerinde (10.2-10.4 mm) ve *Staphylococcus aureus* straini üzerinde ise (10.4-10.8 mm) inhibisyon zon değerlerini vermiştir. Bu sonuçlara bakıldığında yasemin yağının yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu söylenebilmektedir.

Kalagatur vd.,2018 yılında yaptığı çalışmada, ylang-ylang bitkisinden elde ettikleri ekstratları kromatrografik yöntemler ile ayırmış ve elde ettikleri 35 tane bileşenin tek tek ve farklı kombinasyonlarının antifungal etkisine bakmışlardır. Özellikle bitki patojeni olarak bilinen ve mikotoksin oluşturması ile insan sağlığını tehdit eden *Fusarium graminearum* türü fungusa karşı antifungal aktivitesi çalışılmıştır. Aynı zamanda bu çalışma biyoaktivitesi yüksek olan ylang-ylang bitkisi uçucu yağların mikotoksin inhibe edici etkisi olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda ylang-ylang uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi olduğu bulunmuştur.

Misra ve Dey (2012) sandal ağacı yağı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesine dokuz gram negatif ve beş gram pozitif bakteri strainine karşı disk difüzyon, agar nokta ve TLC biyootografi yöntemleriyle bakmışlardır. Sandal ağacı yağı için minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK), taranan test mikroorganizmalarının çoğu için 0.078-5 µg aralığında olduğu belirlenmiştir. Biyootografi sonuçları, somatik embriyo özütlerinde ve sandal ağacı yağında potansiyel antimikrobiyal bileşenlerin varlığını göstermiştir (Misra ve Dey, 2012). Bizim çalışmamızda ise sandal ağacı yağının 2 gram negatif ve 1 gram pozitif bakteri straini üzerine antimikrobiyalve antibiyofilm etkisi farklılık göstermiştir. Agar difüzyon yönteminde en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakteri straininde göstermiştir (10.6 mm). Disk buharlaşma yönteminde Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*) uçucu yağı 5 µL'lik ve 10 µL'lik aktarımda en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Escherichia coli* ATCC (25922) bakteri straininde göstermiştir. 5 µL'lik aktarımda en düşük aktiviteyi 10.1 mm'lik inhibisyon zonunun oluşumuyla *Escherichia coli* ATCC (35200) straininde gösterirken, 10.2 mm'lik inhibisyon zonuyla *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC (35200), *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) bakterileri üzerinde aynı minimum inhibisyon konsantrasyonunu (100 µg/ml) göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterisinde ise daha fazla

antimikrobiyal bir etki göstermiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (200 ug/ml) değerini vermiştir. Spektrofotometre ölçüm değerlerine bakıldığında ise 0.0041 değeri ile biyofilm oluşumu üç test mikroorganizmasında da 100 (µg/ml)'den başladığı söylenebilmektedir.

Niu, C ve arkadaşları 2004 yılında Kristal viyole boyamasına dayalı bir teknik olan spesifik biyofilm oluşumu (SBF) deneyini uygulayarak bitkisel uçucu yağların biyofilm oluşumunu etkileyen bileşenleri bulmayı amaçlamıştır. Tarçın, sinameki ve sitronella yağları *Escherichia coli* ATCC (33456), *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) ve *Pseudomonas putida* (KT24409) bakteri strainlerine uygulanmıştır. *Escherichia coli* uygulanan uçucu yağlara karşı biyofilm gelişimi farklı şekilde etkilenmiştir. Uçucu yağlardan cinnamaldehyde, Luria-Bertani maddelerini içeren uçucu yağların *Escherichia coli* üzerinde biyofilm oluşumunu negatif etkilemiştir. *Escherichia coli* biyofilmleri konfokal lazer tarama mikroskopu ile (CLSM) incelenmiştir ve sinamaldehyt etken maddesini taşıyan tarçın yağının *Escherichia coli* biyofilmine morfolojik hasar verdiği gözlemlenmiştir (Niu ve Gilbert 2004).

Bizim çalışmamızda ise, agar difüzyon tekniğinde üç test mikroorganizması üzerinde en az etkiyi Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) uçucu yağı göstermiştir. Disk difüzyon tekniğinde ise Bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağı en az etkiyi göstermiştir.

Lv vd., (2014) yılında Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağının ve altı ana bileşeninin antimikrobiyal aktivitesine *Escherichia coli* MTCC (443) strainin üzerinde araştırmışlardır. Çalışmalarında tüp dilüsyon tekniği ve minimum inhibitör konsantrasyon tekniklerini kullanmışlardır. *Escherichia coli* MTCC (443) straini yasemin yağına karşı 25 µl konsantrasyonda duyarlılık göstermiştir. Bizim çalışmada kullandığımız *Escherichia coli* bakteri strainleri farklı olsa dahi Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağının her iki *Escherichia coli* strainine karşı minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 25 µl olarak belirlenmiştir. Bulunan konsantrasyon değeri bizim çalışmamızı destekler niteliktedir (Lv vd.,2014).

Bizim çalışmamızda,en yüksek antibiyofilm aktiviteyi Ylang-ylang (*Cananga odorata*) ve yasemin (*Jasminum nudiflorum*) uçucu yağları göstermiştir. Ylang-ylang (*Cananga odorata*)*Escherichia coli*ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) strainleri üzerinde 50(ug/ml) konsantrasyonda biyoflm oluşumunu inhibe ederken *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) straininde 25 (ug/ml) konsantrasyonda biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*) yağı ise *Escherichia*

*coli*ATCC (35200) strainini 25 (ug/ml) konsatrasyonda, *Escherichia coli* ATCC (25922) strainini 12.5 (ug/ml) konsatrasyonda, *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) strainini ise 25 (ug/ml) konsantrasyonda biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir.

Sonuç olarak;

Tablo 4. 1.Agar Difüzyon Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (*Cananga odorata*), 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*), 3.Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), 5.Bergamot (*Citrus bergamia*), 6. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), ve Chloromphenicol test bakterileri (*S. aureus*, *E. coli* ATCC 35200 ve *E. coli* ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (μ L/mm)

Test Bakterileri			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (35200)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)
Uçucu Yağlar	1	5 μ L	10.1 mm	10.02 mm	10.02 mm
		10 μ L	10.2 mm	10.1 mm	10.2 mm
	2	5 μ L	10.4 mm	10.2 mm	10.2 mm
		10 μ L	10.8 mm	10.4 mm	10.4 mm
	3	5 μ L	10.2 mm	10.2 mm	10.02 mm
		10 μ L	10.6 mm	10.4 mm	10.04 mm
	4	5 μ L	0.05mm	0.05mm	0.01mm
		10 μ L	0.1mm	0.1mm	0.02mm
	5	5 μ L	10.1 mm	10.02 mm	10.02 mm
		10 μ L	10.2 mm	10.04 mm	10.04 mm
	6	5 μ L	10.02 mm	10.02 mm	10.02 mm
		10 μ L	10.04 mm	10.04 mm	10.04 mm
	Chloromphenicol	5 μ L	10.1 mm	10.6 mm	10.4 mm
		10 μ L	10.2 mm	11 mm	11 mm

Test edilen uçucu yağlardan en yüksek antimikrobiyal etkiyi Yasemin ve sandal ağacı yağları göstermiştir. Yasemin uçucu yağı yağ asidi, parafin, metil ester türevleri taşır. Sandal ağacı yağı ise Tanen, arbutin, glikozitler, fenol türevleri ve kateşin türevleri taşır. Yapı itibariyle bu maddeleri taşıyan uçucu yağlar gram negatif *Escherichia coli* ATCC (35200)straini üzerinde en yüksek antimikrobiyal etkiyi göstermiştir (10.2 mm-10.4 mm) (Tablo 4.1).

Escherichia coli ATCC (25922) bakterisi üzerinde en yüksek antimikrobiyal etkiyi Yasemin yağı göstermiştir.(10.2 mm-10.4 mm) Bu durum göstermektedir ki gram negatif

bakteri olan her iki *Escherichia coli* straini üzerinde de yasemin yağı yüksek antimikrobiyal etki göstermiş ve üremeleri üzerinde en yüksek oranda olumsuz etkiyi bu uçucu yağ göstermiştir. (Tablo 4.1) Aynı şekilde *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) gram pozitif bakterisi üzerinde yine en yüksek antimikrobiyal etkiyi Yasemin yağı göstermiştir. (10.4 mm-10.8 mm) (Tablo 4.1) Agar difüzyon yönteminde hem gram negatif hem de gram pozitif bakteri strainleri üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi yasemin yağı göstermiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki Yasemin yağı bu patojen bakterilerin üremelerini engelleyebilmekte ve popülasyon yoğunluklarını arttırmalarını olumsuz yönde etkilemektedir.

Tablo 4. 2. Disk Buhar Yöntemi ile test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (*Cananga odorata*), 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*), 3. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), 5. Bergamot (*Citrus bergamia*), 6. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), ve Chloromphenicol test bakterileri (*S. aureus*, *E. coli* ATCC 35200 ve *E. coli* ATCC 25922) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları (µL/mm)

Test Bakterileri			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (29213)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (35200)	<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)
Uçucu Yağlar	1	5µL	10.2 mm	10.2 mm	10.02 mm
		10µL	11 mm	10.4 mm	10.04 mm
	2	5µL	10.02 mm	10.4 mm	10.02 mm
		10µL	10.1 mm	10.8 mm	10.04 mm
	3	5µL	10.2 mm	10.1 mm	10.4 mm
		10µL	10.6 mm	10.2 mm	11 mm
	4	5µL	10.1 mm	10.1 mm	10.04 mm
		10µL	10.2 mm	10.02 mm	10.02 mm
	5	5µL	10.1 mm	10.04 mm	10.04 mm
		10µL	10.4 mm	10.04 mm	10.04 mm
	6	5µL	10.4 mm	10.2 mm	10.2 mm
		10µL	11 mm	10.6 mm	10.6 mm
	Chloromphenicol	5µL	10.2 mm	10.2 mm	10.02 mm
		10µL	10.6 mm	10.6 mm	10.4 mm

Escherichia coli ATCC (35200) straini üzerinde disk buharlaşma yönteminde en yüksek antimikrobiyal etkiyi yine Yasemin yağı göstermiştir. (10.4 mm- 10.8 mm) Bir diğer yüksek etkiyi ise Ylang-ylang yağı göstermiştir. (10.2 mm-10.4 mm) *Escherichia coli* ATCC (25922) straini üzerinde ise en yüksek antimikrobiyal etkiyi ise Sandal ağacı yağı (10.4 mm- 11 mm) ve Günlük ağacı yağı (10.2 mm- 10.6 mm) göstermiştir.

Staphylococcus aureus ATCC (29213) straini üzerine en yüksek antimikrobiyal etkiyi Günlük ağacı yağı (10.4 mm-11 mm) ve Ylang-ylang yağı (10.2 mm- 11 mm) göstermiştir. Disk buharlaşma yönteminde agar difüzyondan farklı olarak her bakteri üzerinde farklı uçucu yağlar etki göstermiştir. Ortak olarak en fazla antimikrobiyal etkiyi Ylang-ylang ve Günlük ağacı yağları göstermiştir. Bu yağların en belirgin ortak özellikleri kullanılan yağlar içerisinde en keskin kokuya sahip olmalarıdır. Bu çalışma göstermektedir ki petri kapağına aktarımı yapılan yağların bakteriler üzerindeki etkisi kokularının keskinliğine bağlı olarak gelişim göstermiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4. 3. Test edilen uçucu yağların (Ylang-ylang (*Cananga odorata*), 2. Yasemin (*Jasminum nudiflorum*), 3. Sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), 4. Sedir ağacı (*Cedrus atlantica*), 5. Bergamot (*Citrus bergamia*), 6. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*), ve Chloromphenicol test bakterileri (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 35200 ve *Escherichia coli* ATCC 25922) üzerinde $\mu\text{g/ml}$ cinsinden minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MIC) ($\mu\text{g/ml}$)			
Test Materyali	Test Mikroorganizmaları		
	Ecoli 35200	S.aureus	E.coli 25922
Ylangylang(<i>Canangaodoata</i>)	50	50	100
Yasemin(<i>Jasminumnudiflorum</i>)	25	12.5	25
Sandalağacı(<i>Arbutusandrachne</i>)	100	100	200
Sedirağacı(<i>Cedrusatlantica</i>)	200	200	200
Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>)	100	100	200
Günlükağacı(<i>Liquidambarorientalis</i>)	100	100	100
Chloromphenicol	25	50	25

Minimum inhibisyon konsantrasyonuna göre de en yüksek antimikrobiyal etkiyi Yasemin yağı ve Ylang ylang yağlarının gösterdiği gözlemlenmiştir. Yasemin yağı gram negatif akteriler olan *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) bakterileri üzerinde Chloromphenicol antibiyotiği ile aynı antimikrobiyal etkiyi göstermiş ve 25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığı MİK olarak belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) üzerinde ise Yasemin yağı Chloromphenicol'den daha fazla antimikrobiyal aktiviteye göstermiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4. 4. Uçucu yağların test mikroorganizmaları üzerinde biyofilm inhibisyonunun saptanması

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MIC)(µg/ml)			
Test Materyali	Test Mikroorganizmaları		
	Ecoli 35200	S.aureus	E.coli 25922
Ylangylang(<i>Canangaodoata</i>)	0.070	0.210	0.212
Yasemin(<i>Jasminumnudiflorum</i>)	0.076	0.082	0.065
Sandalağacı(<i>Arbutusandrachne</i>)	0.041	0.006	0.016
Sedirağacı(<i>Cedrusatlantica</i>)	0.081	0.021	0.004
Bergamot (<i>Citrus bergamia</i>)	0.192	0.118	0.096
Günlükağacı(<i>Liquidambarorientalis</i>)	0.032	0.077	0.026
Chloromphenicol	0.035	0.067	0.037

Biyofilm inhibisyonunun saptanmasında en fazla etki Yasemin yağı ile olmuştur. Yasemin yağı *Escherichia coli* ATCC (35200) ve *Escherichia coli* ATCC (25922) gram negatif bakteri strainlerine karşı Chloromphenicol ile aynı oranda antibiyofilm etki göstermiştir. (25 µg/ml) *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) gram pozitif bakteri strainine karşı ise Chloromphenicol antibiyotiginden bile daha fazla antimikrobiyal bir etki göstermiştir. (Tablo 3.14)

Bu çalışmanın devamında *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* dışında enfeksiyon etmenleri özellikle fungal etmenler örneğin *Candida albicans* strainleri üzerinde etki testleri yapılmalıdır. Ayrıca bu çalışmada etkisi yüksek saptanan yağlar özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* kontaminasyonlarını önlemeye yönelik kozmetik ürünlerinde özellikle el dezenfeksiyonu ve bakımı ürünlerinde değerlendirilme potansiyeline sahiptir.

Bu tür çalışmalar şüphesiz tıp, çevre, hastane ortamlarında oluşabilecek bakteriyel kontaminasyonlarının ve insanlarda biyofilm oluşumuna bağlı enfeksiyon oluşumlarının engellenmesinde ve bu tür oluşumlarla mücadelede önemli katkılar sağlayacak niteliktedir.

KAYNAKÇA

- Adams, R. P. (1991). Cedar wood oil—Analyses and properties. In *Essential oils and waxes* (pp. 159-173). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ahmad, I., & Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of ethnopharmacology*, 74(2), 113-123.
- AYDINGÖZ, M., & Bulut, S. (2014). Egenin Gizli Kalmış Şifa İksiri: Sığla. *Afyon Kocatepe University Journal of Science & Engineering*, 14(1).
- Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food control*, 61, 156-164.
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. In *Bacterial Biofilms* (pp. 249-289). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Butaye, P., Devriese, L. A., & Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 175-188.
- Cengiz, A. T. (1999). *Staphylococcus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, 339-47.
- Conner, D. E. (1993). Naturally occurring compounds. In 'Antimicrobials in foods'. (Eds PM Davidson, AL Branen) pp. 441–468.
- Costerton, J. W. (2004). A short history of the development of the biofilm concept. In *Microbial biofilms* (pp. 4-19). American Society of Microbiology
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology*, 176(8), 2137.
- Çalıkoğlu, E., Kıralan, M., & Bayrak, A. (2006). Uçucu Yağ Nedir, Nasıl Üretilir ve Türkiye'deki Durumuna Genel Bir Bakış. *Türkiye*, 9, 24-26.
- Çiftçi, Z. (2005). Kronik tonsillitte biofilmin rolü. *TC Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi*, 69.
- Dahiya, P., & Purkayastha, S. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(5), 443.

- de Groot, A. C., & Schmidt, E. (2017). Essential oils, part VI: sandalwood oil, ylang-ylang oil, and jasmine absolute. *Dermatitis*, 28(1), 14-21.
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International journal of food microbiology*, 5(2), 165-180.
- DIANI, M., ARIAFAR, M. N., & Akçelik, N. (2015). İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., ... & Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. *Letters in applied microbiology*, 36(1), 35-40.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563.
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 6(12), 484-488.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- Hoiby, N., Flensburg, E. W., Beck, B., Friis, B., Jacobsen, S. V., & Jacobsen, L. (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scandinavian journal of respiratory diseases*, 58(2), 65-79.
- Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4), 272-275.
- İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & DEMİrci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(14), 3943-3946.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.

- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiology letters*, 236(2), 163-173.
- Kalagatur, N. K., Mudili, V., Kamasani, J. R., & Siddaiah, C. (2018). Discrete and combined effects of Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) essential oil and gamma irradiation on growth and mycotoxins production by *Fusarium graminearum* in maize. *Food control*, 94, 276-283.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic escherichia coli. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123.
- Karapinar, M., & Aktuğ, Ş. E. (1987). Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International Journal of Food Microbiology*, 4(2), 161-166.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., ... & Lian, J. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357(9264), 1225-1240.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13611-13614.
- Lasa, I., & Penadés, J. R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*, 157(2), 99-107.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Li, C. J. (2008). Cross-dehydrogenative coupling (CDC): exploring C–C bond formations beyond functional group transformations. *Accounts of chemical research*, 42(2), 335-344.
- Lv, Y., Yang, F., Li, X., Zhang, X., & Abbas, S. (2014). Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, 35, 305-314.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., ... & Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot

- (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of applied microbiology*, 103(6), 2056-2064.
- Misra, B. B., & Dey, S. (2012). Comparative phytochemical analysis and antibacterial efficacy of in vitro and in vivo extracts from East Indian sandalwood tree (*Santalum album* L.). *Letters in applied microbiology*, 55(6), 476-486.
- Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12), 6951-6956.
- Oosterhaven, K., Leitao, A. C., Gorris, L. G. M., & Smid, E. J. (1996). Comparative study on the action of S-(+)-carvone, in situ, on the potato storage fungi *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *F. sulphureum*. *Journal of applied bacteriology*, 80(5), 535-539.
- Öztürk, Ş. B., Sakarya, S., Öncü, S., & Ertuğrul, M. B. (2008). Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klimik Derg*, 21(3), 79-86.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., & Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1), 585-617.
- Rahman, M. M., Lopa, S. S., Sadik, G., Islam, R., Khondkar, P., Alam, A. K., & Rashid, M. A. (2005). Antibacterial and cytotoxic compounds from the bark of *Cananga odorata*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 758-761.
- Rijnaarts, H. H., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, J., & Zehnder, A. J. (1993). Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(10), 3255-3265.
- Smid, E. J., Koeken, J. G. P., & Gorris, L. G. M. (1996). Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone. In *'Modern Fungicides and Antifungal Compounds'* (pp. 173-180).
- Stickler, D. J., Evans, A., Morris, N., & Hughes, G. (2002). Strategies for the control of catheter encrustation. *International journal of antimicrobial agents*, 19(6), 499-506.
- Svensäter, G., Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D., & Hamilton, I. R. (2001). Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS microbiology letters*, 205(1), 139-146.
- Şahin, R. (2007). *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması.

- ŞİMŞEK, N., & BULUT, E. T. (2012). Biyofilm ve Endodonti: Bölüm. *İnönü sağlık bilimleri dergisi*, 2, 1-5.
- Toroğlu, S., Dığrak, M., & Çenet, M. (2006). Baharat olarak tüketilen *Laurus nobilis* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyotiklere in-vitro etkilerinin belirlenmesi. *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9, 20-6.
- Uçan, F. (2008). Di-Limonenin Mayalar Üzerine Antifungal Etkisi. *ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ABD Yüksek Lisans Tezi*.
- Valero, M., & Salmeron, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 73-81.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., ... & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377-410.
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and infection*, 4(4), 481-489.
- Zaidan, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A., & Zakiah, I. (2005). In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop biomed*, 22(2), 165-170.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ece GÜRBÜZ
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı : İzmir / 1991
E-posta :eecegurbuz@outlook.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2019-Şimdiye kadar, Yüksek Lisans (YL), Eskişehir Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Genel Biyoloji Anabilim Dalı/Eskişehir/TÜRKİYE
- 2009-2014 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü Lisans
- 2005-2009 Osmangazi Lisesi/Osmangazi/BURSA

Tecrübeler:

- 2010-2014 Zift Danışmanlık/Proje Danışmanlığı/ESKİŞEHİR
- 2015-2016 Afiş Danışmanlık/Proje Danışmanlığı/AFYONKARAHİSAR
- 2016-Devam ESOGÜ Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (TICAM) /Biyolog/ESKİŞEHİR