



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***COTINUS COGGYGRİA* SCOP. VE *RHUS CORİARIA* L. ETİL
ASETAT EKSTRAKTLARININ ANTİBAKTERİYEL VE
ANTİBİYOFİLM ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Araş. Gör. Dr. Baki TAŞTAN

UZMANLIK TEZİ

TOKAT - 2025



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***COTINUS COGGYGRİA* SCOP. VE *RHUS CORIARIA* L. ETİL
ASETAT EKSTRAKTLARININ ANTİBAKTERİYEL VE
ANTİBİYOFİLM ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Araş.Gör. Dr. Baki TAŞTAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. UMUT SAFİYE ŞAY COŞKUN

TOKAT – 2025

TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanması ve uzmanlık eğitimim dönemlerinde her zaman yanımda olan ve maddi, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Umut Safiye Şay Coşkun'a, uzmanlık eğitimim boyunca desteğini, bilgi ve becerilerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülgün Yenişehirli'ye , kısa bir süre çalışma imkânı bulduğum tecrübeleri ve bilgi birikimiyle desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yunus Bulut'a, bitkisel ekstraktları temin eden Sayın Prof. Dr. Ramazan Erenler'e, bana samimi ve sıcak bir ortam sağlayan, tüm güler yüzlü mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Özellikle tez çalışmam süresince hayatımı kolaylaştırmak için gösterdiği özveriyle her zaman yanımda olan, sevgisini ve desteğini daima hissettiren değerli eşim Sayın Serap Taştan'a ve sevgili oğullarım Ahmet Fevzi, Abdullah ve Kerem'e minnettarım.

ÖZET

Günümüzde, antibiyotiklere karşı gelişen direnç küresel ölçekte ciddi bir tehdit haline gelmiştir. Özellikle biyofilm oluşturan bakteriyel enfeksiyonların tedavisi son derece zorlaşmıştır. Bu durum farklı kaynaklardan yeni antimikrobiyal etkili maddelerin araştırılmasını gündeme getirmiştir. Bu çalışmanın amacı *Cotinus coggygria* Scop. (duman ağacı) ve *Rhus coriaria* L. (sumak) bitki ekstraktlarının; *S.aureus* (MRSA), *S. aureus* (MSSA), *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *K. pneumonia*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae* ve *S.marcescens* bakterilerinin standart suşları üzerindeki antibakteriyel ve antibiofilm etkilerini araştırmaktır. Antibakteriyel etkinlik, CLSI önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon testi ile, antibiyofilm etkinlik ise mikrotitrasyon plaka yöntemi ile değerlendirildi. *C. Coggygria* Scop. ile yapılan çalışmalarda; en düşük Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri (2,5 mg/mL) *S. epidermidis*, *E. coli*, *A. baumannii* ve *S. marcescens* suşlarında gözlemlendi. Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) düzeyinde ise yalnızca *A. baumannii* suşu 2,5 mg/mL ile en düşük değeri gösterdi. *E. faecalis* ve *A. baumannii* suşlarında MİK ve MBK değerleri eşit bulundu. En fazla biyofilm inhibisyonu %47,39 ile *E. faecalis* suşunda, biyofilm eradikasyon ise %83,21 ile *P. aeruginosa* suşunda gerçekleşti. *R. coriaria* L. Ekstraktı için en düşük MİK değeri (0,62 mg/mL) MRSA ve *S. epidermidis* suşlarında gözlemlendi. MBK değerlendirmesinde, *S. epidermidis* ve *A. baumannii* suşları 1,25 mg/mL ile en düşük değeri gösterdi. Biyofilm inhibisyonu en yüksek oranda (%46,96) MSSA suşunda, biyofilm eradikasyonu ise en yüksek oranda (%38,93) *E. faecalis* suşunda gözlemlendi. Sonuç olarak, *C. coggygria* Scop. ve *R. coriaria* L. ekstraktları, toplum kökenli ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarla sıklıkla ilişkilendirilen, klinik açıdan önemli referans suşlara karşı değişen düzeylerde antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteler göstermiştir. Bu bitkiler antibiyotiklere dirençli patojenlerin kontrolünde umut vadeden doğal alternatifler arasında yer almakta ve gelecekteki tedavi stratejilerine önemli katkılar sunabilecek potansiyele sahiptir.

Anahtar Kelimeler: *Cotinus coggygria* Scop., *Rhus coriaria* L., minimal inhibitör konsantrasyon, minimal bakterisidal konsantrasyon, biyofilm

ABSTRACT

Nowadays, antibiotic resistance has emerged as a serious global threat. In particular, the treatment of bacterial infections associated with biofilm formation remains highly challenging. This challenge has highlighted the urgent need to explore novel antimicrobial agents from alternative sources. Among these, the extraction and therapeutic application of antimicrobial agents derived from medicinal plants have gained significant momentum. The aim of this study was to investigate the antibacterial and antibiofilm activities of *Cotinus coggygia* Scop. (Smoke tree) and *Rhus coriaria* L. (sumac) plant extracts were evaluated against standard strains of *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* (MSSA), *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, and *S. marcescens*. Antibacterial activity was assessed using the broth microdilution method in accordance with CLSI guidelines, while antibiofilm activity was evaluated via the microtiter plate assay. For *C. Coggygia* Scop., the lowest MIC value (2.5 mg/mL) was observed against *S. epidermidis*, *E. coli*, *A. baumannii*, and *S. marcescens*. At the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) level, only *A. baumannii* exhibited the lowest value of 2.5 mg/mL. In *E. faecalis* and *A. baumannii* strains, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values were found to be equal. The highest biofilm inhibition was recorded in *E. faecalis* (47.39%), while the highest eradication rate was observed in *P. aeruginosa* (83.21%). For *R. coriaria* L., the lowest MIC value (0.62 mg/mL) was detected in MRSA and *S. epidermidis* strains. In MBC evaluations, *S. epidermidis* and *A. baumannii* showed the lowest values (1.25 mg/mL). The highest biofilm inhibition was observed in the MSSA strain (46.96%), while the highest eradication rate was recorded in *E. faecalis* (38.93%). In conclusion, *C. coggygia* Scop. and *R. coriaria* L. extracts exhibited varying levels of antibacterial and antibiofilm activities against clinically significant reference strains commonly associated with community-acquired and nosocomial infections. These plant extracts represent promising natural alternatives for the control of antibiotic-resistant pathogens and may contribute significantly to future therapeutic strategies.

Keywords: *Cotinus coggygia* Scop., *Rhus coriaria* L, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, biofilm

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarında kullanılan Mikroorganizma Türlerinin Temel Özellikleri	5
2.1.1 Gram negatif bakteriler	5
2.1.2 Gram pozitif bakteriler	13
2.2 Biyofilm	16
2.3. Tıbbi Bitkilerin Tarihsel Kullanımı	22
2.4. Bitkilerin Antimikrobiyal Önemi	23
2.5 Çalışmada Kullanılan Tıbbi Bitkiler	25
2.5.1 <i>Cotinus coggygia</i> Scop. (duman ağacı)	25
2.5.2. <i>Rhus coriaria</i> L.(sumak)	26
2.6 Antibakteriyel Duyarlılık Testleri	27
2.6.1 Sıvı Mikro Dilüsyon Yöntemi	29
2.7 Biyofilm Oluşumunu Saptama Yöntemleri	30
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1 Mikroorganizmalar	39
3.2 Bitkisel Ekstraktlar	40
3.3 Besiyerleri	40
3.4 Antimikrobiyal Çalışmalar	41
3.4.1 Mikroorganizmaların canlandırılması	41

3.4.2 Mikroorganizma Süspansiyonlarının Hazırlanması	42
3.4.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	42
3.4.4 Antibiyofilm Etkinlik çalışmaları	44
4. BULGULAR	48
4.1 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi	48
4.1.1 <i>Cotinus coggygia</i> Scop. Etil Asetat Ekstraktı:	
Mikrodilüsyon Bulguları	48
4.1.2 <i>Rhus coriaria</i> L. Etil Asetat Ekstraktı: Mikrodilüsyon Bulguları	50
4.2 Antibiyofilm Etkinlik Değerlendirilmesi	52
4.2.1 <i>Cotinus coggygia</i> Scop. Ekstraktının Biyofilm İnhibisyonu ve	
Eradikasyonuna Yönelik Deneysel Bulgular	54
4.2.2 <i>Rhus coriaria</i> L. Ekstraktının Biyofilm İnhibisyonu ve	
Eradikasyonuna Yönelik Deneysel Bulgular	59
5.TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	78

KISALTMALAR

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

ATCC: American Type Culture Collection

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

ÇİD: Çoklu İlaç Drenci

DMSO : Dimetilsülfoksit

eDNA: Çevresel DNA

EMB: Eosin Methylene Blue

EPS: Ekstraselüler Polimerik Madde

ESBL: Extended-Spectrum Beta-Lactamases

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

KAMHB: Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth

KDE: Kan Dolaşım Enfeksiyonu

KKA: Koyun Kanlı Agar

KOB: Koloni Oluşturan Birim

MBK: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon

MİK: Minimal inhibitör Konsantrasyon

MRSA: Metisilin Rezistans Staphylococcus aureus

MSSA: Metisilin sensitiv Staphylococcus aureus

OD: Optik Dansite

TSB: Tryptic Soy Broth

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Gram negatif bakteri hücre duvar yapısı	6
Şekil 2: Gram pozitif bakteri hücre duvar yapısı	13
Şekil 3: Biyofilm oluşum basamakları	18
Şekil 4: Çeşitli antimikrobiyallere karşı biyofilm toleransının genel mekanizması	20
Şekil 5: <i>Cotinus coggygria</i> Scop. bitkisi	26
Şekil 6: Sumak bitkisi ve baharat ürünü	27
Şekil 7: Mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK'nun belirlenmesi	30
Şekil 8: MİK'in değerlendirildiği mikroplağın şematik gösterimi	43
Şekil 9: <i>Rhus coriaria</i> L. ve <i>Cotinus coggygria</i> Scop. bitkisel ekstraktlarının antibiyofilm etkinlik çalışması (İnhibisyon)	53
Şekil 10: <i>Rhus coriaria</i> L. ve <i>Cotinus coggygria</i> Scop. bitkisel ekstraktlarının antibiyofilm etkinlik çalışması (eradikasyon)	53
Şekil 11: <i>Cotinus coggygria</i> Scop. bitkisel ekstraktının biyofilm inhibisyon sonuçları	56
Şekil 12: <i>Cotinus coggygria</i> Scop. bitkisel ekstraktının biyofilm eradikasyon sonuçları	59
Şekil 13: <i>Rhus coriaria</i> L. bitkisel ekstraktının biyofilm inhibisyon sonuçları	61
Şekil 14: <i>Rhus coriaria</i> L. bitkisel ekstraktının biyofilm eradikasyon sonuçları	63

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	39
Tablo 2: <i>Cotinus coggyria</i> scop. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MİK	49
Tablo 3: <i>Cotinus coggyria</i> scop. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MBK	50
Tablo 4: <i>Rhus coriaria</i> L. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MİK	51
Tablo 5: <i>Rhus coriaria</i> L. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MBK	52
Tablo 6: <i>Cotinus coggyria</i> Scop. ekstraktının biyofilm İnhibisyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve inhibisyon yüzdeleri	54
Tablo 7: <i>Cotinus coggyria</i> Scop. ekstraktının biyofilm eradikasyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve eradikasyon yüzdeleri	57
Tablo 8: <i>Rhus coriaria</i> L. ekstraktının biyofilm İnhibisyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve inhibisyon yüzdeleri	60
Tablo 9: <i>Rhus coriaria</i> L. ekstraktının biyofilm eradikasyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve eradikasyon yüzdeleri	62

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde antibiyotik direnci, bakterilerden kaynaklanan en ciddi halk sağlığı tehditlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Bakterilerin üç veya daha fazla antibiyotik grubunda, en az bir ilaca karşı direnç geliştirmesiyle tanımlanan çoklu ilaç direnci (ÇİD), antibiyotiklerin etkinliğini ciddi şekilde azaltmaktadır. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç; farklı antibiyotik sınıflarını kapsayarak, antibiyotik direncinin küresel ölçekte ciddi bir tehdit haline gelmesine yol açmıştır. Günümüzde, dünyanın bazı bölgelerinde mevcut tüm antibiyotiklere karşı dirençli enfeksiyon etkenlerinin ortaya çıkmaya başladığı bildirilmektedir. Bu durum, antimikrobiyal direncin yalnızca enfeksiyon tedavisini değil; aynı zamanda kemoterapi, organ nakli ve cerrahi gibi birçok tıbbi müdahaleyi de riskli hale getirdiğini göstermektedir (1). Antibiyotiklerin insanlar tarafından uygunsuz olarak kullanılmasının yanında; gıda endüstrisinde, hayvancılıkta, tarımsal faaliyetlerde kontrolsüz olarak kullanılması da direnç sorununun ve ÇİD’li mikroorganizmaların hızla çoğalmasının nedenleri arasında gösterilmektedir (2).

ÇİD’li suşlarla gelişen hastane enfeksiyonları; hastanede yatış süresini ve ölüm oranlarını artırmakta, aynı zamanda da önemli oranda maliyet artışına neden olmaktadır (3). Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından 2019 yılında yayımlanan Antibiyotik Direnç Tehditleri Raporu’na göre, Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) her yıl 2,8 milyondan fazla antibiyotik dirençli bakteriye bağlı enfeksiyon meydana gelmekte ve 35.000’den fazla kişi yaşamını yitirmektedir (4). Antimikrobiyallere dirençli enfeksiyonlar nedeniyle dünya çapında her yıl yaklaşık 700.000 kişinin öldüğü tahmin edilmektedir. Bu duruma bir çözüm bulamaz ise, bu sayının 2050 yılına kadar yılda 10 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir (5).

Bakteriler; hücre membran geçirgenliğinin azalması, antibiyotiklerin hedeflediği bölgelerde değişiklik, antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin sentezi (penisilinaz gibi) ve özellikle biyofilm formasyonu gibi çok çeşitli direnç mekanizmaları aracılığıyla mevcut antibiyotiklere karşı kolaylıkla dirençli hale gelebilirler ve bu özelliklerini diğer bakterilere aktarabilirler (6).

Antimikrobiyal direncin en önemli nedenlerinden biri olan biyofilm formasyonu, mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere tutunarak kendi ürettikleri organik polimerik bir madde içerisinde, korunaklı bir şekilde kalabilmesini sağlayan yapılardır. Biyofilm aynı zamanda bir mikroorganizma topluluğudur (7). Biyofilm oluşturan bakteriyel enfeksiyonların tedavisi son derece zordur. Biyofilm sentezleyen bakterilerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarının azalması; antimikrobiyal ajanların biyofilm içerisine difüzyonunun fiziksel olarak bozulması, bakteriyel büyüme oranlarının azalması ve antimikrobiyal ajanın işlevini bozabilecek mikroçevredeki yerel değişiklikler gibi birçok faktöre bağlıdır (8). Ayrıca, biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin, horizontal gen transferi mekanizmaları aracılığıyla bakteriler arasında aktarılabilmesi, biyofilm ilişkili antibiyotik direncindeki artışın temelinde yatan önemli bir faktördür (9).

Antibiyotiklere karşı gelişen direnç problemini çözmek için yeni ajanlara ihtiyaç duyulmasına rağmen, son yıllarda kullanıma giren yeni antibiyotik ajan sayısı oldukça azdır ve giderek de hızla azalmaktadır. Bunun başlıca nedeni, yeni nesil antibiyotiklerin geliştirilmesine odaklanan araştırmalardan, finansal verimlilik adına, mevcut antibiyotiklerin yapısında değişiklik yapılmasına doğru bir kayma olmasıdır (10).

Tüm bu nedenlerden dolayı, dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde; etkili, güvenli, ucuz ve bakteri direncine neden olmayacak yeni antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç vardır. Bu durum, bilim insanlarını

farklı kaynaklardan yeni antimikrobiyal etkili maddeleri araştırmaya yöneltmiştir. Özellikle tıbbi bitkilerden, antimikrobiyal etkili maddeler elde edip tedavide kullanma çalışmaları hız kazanmıştır. Yan etkilerinin, sentetik ürünlerle karşılaştırıldığında, çok daha az olması; bitkileri, özellikle uzun süre tedavi gerektiren hastalıklarda kullanılabilecek alternatif bir tedavi kaynağı haline getirmektedir.

İnsanlar, eski çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde bitkileri kullanmayı denemiş ve olumlu sonuçlar gözlemlemiştir. Antik Mısır, Çin, Hindistan, İran ve bazı Avrupa ülkelerinde, bitkilerin hastalıklara karşı tedavi edici etkileri olduğuna inanılmıştır. Eski çağlardan günümüze, tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin sayısında önemli bir artış olmuştur (11). Fransız hekim Henri Leclerc tarafından literatüre kazandırılan, tıbbi bitkilerle tedavi anlamına gelen Fitoterapi kavramı, 1900'lü yıllardan beri kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler, mikroorganizma inhibisyonu ve insan sağlığı üzerindeki etkileri araştırılmak üzere, 1926'dan beri laboratuvarlarda kullanılmaktadır (12).

Bitkilerden elde edilen doğal, birincil ve ikincil metabolitler, doğrudan veya dolaylı olarak endüstriyel sektörün temel hammaddesini oluşturmaktadır. Gıda ve besin maddelerine eklenen yenilebilir tıbbi bitkiler ve baharat bitkilerinin, antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve gıdalardaki mikroorganizmaları yok ettiği veya çoğalmasını önlediği düşünülmektedir (13).

Yapılan araştırmalar, gıdalara eklenen baharat ve diğer gıdalarda bulunan antimikrobiyal aktiviteye sahip maddelerin, bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bitkilerin antimikrobiyal etkileri üzerine, daha önce yapılan araştırmaların çoğu, bitkinin kök, gövde, yaprak ve rizom özütleri ile gerçekleştirilmiştir. Fakat, bitkilerin tohum, çiçek ve meyvesinden de antimikrobiyal bileşenler elde edilebilir. Bu bitkilerin antimikrobiyal etkinliği, bitkinin türüne ve bileşimine, konsantrasyonuna ve hedef mikroorganizmanın türüne ve

yoğunluğuna bağlıdır. Sıcaklık, pH, proteinler, lipitler ve tuzlar bitkilerin antimikrobiyal etkilerini değiştiren faktörlerdir (14).

Türkiye'nin zengin bitki örtüsü, geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan pek çok bitki türüne ev sahipliği yapmaktadır. *Cotinus coggygia* Scop. (duman ağacı) ve *Rhus coriaria* L. (sumak) bitkileri ülkemizde doğal olarak yetişmekte olup, ekstraktlarının potansiyel bir antimikrobiyal ajan kaynağı olabileceği düşünülmektedir. *Cotinus coggygia* Scop. yaprakları farklı ülkelerde antiseptik, ateş düşürücü, iltihap giderici, kanamayı önleyici, antimikrobiyal ve yara tedavisinde kullanılmaktadır (15). *R. Coriaria* L. bitkisinin, hidrolize edilebilir tanenler, antosiyaninler, gallik asit türevleri, flavonoidler, terpenler, malik ve sitrik asitler gibi çeşitli organik asitler, yağ asitleri, ve vitaminler açısından zengin bir kaynak olduğu düşünülmektedir (16). Bu çalışmanın amacı *Cotinus coggygia* Scop. ve *Rhus coriaria* L. bitki ekstraktlarının; *S.aureus* (MRSA), *S. aureus* (MSSA), *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *K. pneumonia*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae* ve *S.marcescens* bakterilerinin standart suşları üzerindeki antibakteriyel ve antibiofilm etkilerini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

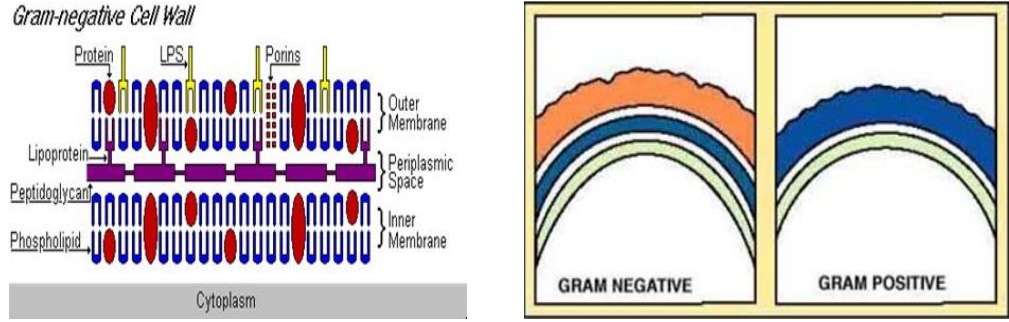
2.1 Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarında kullanılan Mikroorganizma Türlerinin Temel Özellikleri

2.1.1 Gram negatif bakteriler

Klinik laboratuvarlarda en temel inceleme yöntemlerinden biri olan Gram boyama, ilk kez 1884 yılında Hans Christian Gram tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntemde kristal viyole, iyot, etanol ve sulu fuksin veya safranin gibi karşıt boyalar kullanılarak bakteriler boyanır. Gram boyama yöntemiyle yapılan mikroskopik incelemede, hücre duvarı yapılarındaki farklılıklara bağlı olarak Gram pozitif bakteriler mor; Gram negatif bakteriler ise pembe renkte görünür.

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, üç katmandan oluşan kompleks bir yapıya sahiptir: lipopolisakkarit içeren dış membran, hücre şeklini belirleyen peptidoglikan tabakası ve çok işlevli sitoplazmik membran (Şekil 1). Bu yapısal özellikler, Gram negatif bakterilere Gram pozitif türlere kıyasla daha yüksek düzeyde direnç kazandırır ve tüm dünyada ciddi morbidite ve mortaliteye neden olurlar.

Gram negatif basiller, ventilatör ilişkili pnömoni, kateter enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve sepsis gibi nazokomiyal enfeksiyonların çoğundan sorumludur (17).



Şekil 1: Gram negatif bakteri hücre duvar yapısı(18)

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*), sporsuz, hareketli, katalaz pozitif, oksidaz negatif, laktozu fermente eden ve Eosin Metilen Blue (EMB) besiyerinde yeşil refle veren, fakültatif anaerob, gram negatif basildir. *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olan *Escherichia* cinsinin en önemli ve en yaygın üyesidir. *E. coli* suşlarının çoğu doğal olarak sağlıklı insan mikrobiyal florasında bulunur. Ancak bazı suşlar hem bağışıklık sistemi zayıflamış hem de sağlıklı kişilerde enfeksiyona yol açabilir (19).

Patojenik suşlar, hastalığa neden olmalarını sağlayan belirli toksinler ve adhezyon için kullandığı yapıları kodlayan çeşitli patojenite adacıklarına sahiptir. Patojenik *E. coli* beş ana patotipe ayrılır: Shiga benzeri toksin üreten enterohemorajik *E. coli* (STEC), ciddi gıda kaynaklı hastalıklara, hemorajik diyare ve hemolitik üremik sendroma neden olur. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), turist diyaresine ve gelişmekte olan ülkelerde infant diyaresine neden olur. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), gelişmekte olan ülkelerde erişkinlerde diyare, gelişmiş ülkelerde besin kaynaklı hastalıklara yol açar. Barsakta mukus sekresyonunu stimüle eder. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), bağırsak epitelini mekanik olarak tahrip ederek dizanteriye neden olur. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), gelişmekte olan ülkelerde iki yaşın altındaki çocuklarda infant diyaresine neden olur (20).

E. coli, toplum kaynaklı tüm idrar yolu enfeksiyonlarının %80'inden fazlasından ve ayrıca birçok hastane kaynaklı enfeksiyondan sorumludur. Ek olarak, *E. coli* sepsis hastalarından izole edilen en yaygın gram negatif basildir. Dahası, peritonit, menenjit ve apselerin önemli bir nedenidir.

E. coli, birçok antibiyotiğin etkisine karşı koymak amacıyla çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Özellikle heterojen bir enzim grubu olan ve sıklıkla plazmitler tarafından kodlanan genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi oldukça yaygındır. Bu plazmitler ayrıca, aminoglikozitler ve florokinolonlar dahil olmak üzere diğer ilaç sınıflarına direnci kodlayan genleride taşıyabilirler. Çoğu durumda, bir suş birden fazla antibiyotik sınıfına karşı direnç genleri taşımakta olup, bu genleri genetik transfer yoluyla diğer bakterilere aktarabilmektedir. Bu durum, tedavi sürecini önemli ölçüde güçleştirmektedir (21).

Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) , aerobik, oksidaz negatif, katalaz pozitif, hareketsiz, non fermentatif gram negatif (bazen gram pozitifte boyanabilir) kokobasildir. *A. baumannii* saprofittir, doğada (toprak, su ve gıda maddeleri) ve hastane ortamında yaygın olarak bulunur. Nemlendiriciler, mekanik ventilatörler ve kateterler gibi nemli yüzeylerde ve insan derisi gibi kuru yüzeylerde gelişebilirler. Bu bakteriler ayrıca sağlıklı bireylerin küçük bir kısmının normal orofaringeal florasında bulunur ve hastaneye yatış sırasında hızla çoğalabilirler. Bu organizmalar toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilir, ancak enfeksiyonların büyük çoğunluğu nazokomiyal enfeksiyonlardır. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen tüm non fermenter bakteriler arasında *P. aeruginosa*'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır (19).

A. baumannii, esas olarak immün sistemi zayıflamış ve komorbiditesi olan hastaları etkileyen fırsatçı bir patojendir. Hastane ve toplum kaynaklı pnömoni, endokardit, bakteremi, yumuşak doku ve cilt enfeksiyonları, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olur.

Genomik ve fenotipik analizler yoluyla *A. baumannii*'nin kapsül polisakkaritleri, fosfolipazlar, lipopolisakkaritler, dış zar porinleri, proteazlar, biyofilm oluşumu, demir şelatlama sistemleri ve protein salgılama sistemleri gibi birçok virülans faktörü tanımlanmıştır (19).

A. baumannii izolatları; penisilinler, florokinolonlar ve birinci ile ikinci nesil sefalosporinler dahil olmak üzere çok çeşitli antibiyotiklere karşı sıklıkla dirençlidir. Bununla birlikte, bazı izolatlar aminoglikozitler, karbapenemler ve  -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına ( rneğin ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam) duyarlılık gösterebilmektedir. Ancak son yıllarda karbapenem direnci endişe verici şekilde artış göstermektedir. Bu dirençli izolatlar, karbapenem dirençli *A. baumannii* (CRAB) olarak adlandırılmakta ve genellikle yalnızca tigesiklin veya kolistin gibi sınırlı antibiyotiklere duyarlıdır.

A. baumannii'nin antibiyotik direncinde rol oynayan başlıca mekanizmalar arasında çoklu ilaç eflüks pompaları, hedef bölgelerdeki modifikasyonlar, dış zar geçirgenliğinde azalma ve antimikrobiyal ajanların enzimatik inaktivasyonu bulunmaktadır(20).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*), kapsüllü, sporsuz, hareketsiz, fakültatif anaerob, laktozu fermente eden gram negatif basildir. *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olan bakteri, insan gastrointestinal sistem florasında bulunur. Ayrıca çevrede, toprakta, yüzey sularında ve tıbbi cihazlarda bulunabilir. Özellikle tıbbi cihaz yüzeylerinde ve mukozal dokularda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olup, bu özellik bakterinin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasında ve persistan enfeksiyonların gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (21).

K. pneumoniae, nozokomiyal pnömoninin yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilen önemli bir fırsatçı patojendir. Tüm nazokomiyal bakteriyel enfeksiyonların %3 ila %8'inden sorumludur (22). *K. pneumoniae*'nın polisakkarit kapsül üretiminin arttığı hipervirülan serotipleri sağlıklı insanları enfekte edebilir ve nekrotizan fasiit, menenjit, endoftalmit, piyojenik karaciğer absesi, kaviter pnömoni gibi potansiyel olarak ölümcül toplum kökenli enfeksiyonlara neden olabilir. Bu bakteri ayrıca idrar yolu, yara ve yumuşak doku enfeksiyonlarına ve bakteriyemi/sepsis'e neden olur (23).

K. pneumoniae antibiyotik yapısını parçalayan ve onu çoklu ilaca dirençli bir bakteri yapan beta-laktamaz, geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ve karbapenemaz gibi enzimler üretebilir (24). Karbapenem direncinin, eflüks pompalarındaki upregülasyon, ESBL enzim üretimindeki artış ve dış membran değişikliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (25). Çoklu direnç genleri içeren plazmidleri kazanması nedeniyle diğer antimikrobiyal ajanlarada direnç gösterebilirler. Bu nedenle, *K. pneumoniae* enfeksiyonlu hastaların tedavisi son derece zor olabilir (21).

Enterobacter cloacae

Enterobacter cloacae (*E. cloacae*), *Enterobacteriaceae* ailesine ait, Gram-negatif basildir. Hareketli, spor oluşturmeyan, oksidaz negatif, üreaz pozitif ve fakültatif anaerobik özellik gösterir. Özellikle su, toprak, kanalizasyon ve gıda maddelerinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde kommensal mikrobiyota üyesi olarak da yer alır .

Son yıllarda *E. cloacae*, fırsatçı bir patojen olarak klinik açıdan önem kazanmıştır. Özellikle yoğun bakım ünitesinde tedavi gören ve mekanik ventilasyon desteği alan hastalarda, hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en yaygın *Enterobacter* türlerinden biri olarak kabul edilmektedir (26). Bu bakteri; endokardit, osteomyelit, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, septik artrit, alt solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ve bakteriyemi gibi çeşitli klinik tablolarla ilişkilendirilmektedir.

E. cloacae'nin patojenik potansiyeli, biyofilm oluşturma yeteneği ile enterotoksinler ve porin yapısını bozan sitotoksinler gibi çeşitli virülans faktörlerinin üretimiyle ilişkilidir. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar; aminoglikozitler, florokinolonlar, karbapenemler ve polimiksinler gibi antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir (27).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) sporsuz, genellikle kapsülsüz ancak bazıları alginat kapsüllü, hareketli, katalaz ve oksidaz pozitif, non fermenter, gram negatif basildir ve optimal üreme ısıları 37°C-42°C dir. Zorunlu aeroblar olarak

tanımlanmalarına rağmen, alternatif elektron alıcısı olarak nitrat veya arginin kullanarak anaerobik olarak büyüme yeteneğine sahiptirler(28).

P. aeruginosa tatlı veya üzüm benzeri bir koku üretir, bazı suşları beta hemoliz yaparlar. İnsan ve memeli hayvanların bağırsağında flora elemanı olarak bulunur. Çevrede toprakta, bitki örtüsünde, suda ve çürüyen organik maddelerde bulunabilirler. Ne yazık ki hastanenin her yerinde bulunabilirler. Basit büyüme gereksinimleri ve besin çeşitliliği nedeniyle geniş bir çevresel dağılıma sahiptir. Azot ve karbon kaynağı olarak birçok organik maddeyi kullanabilme yeteneğine sahip oldukları için, bazı suşlar eser besinleri kullanarak damıtılmış suda bile büyüebilir (19).

P. aeruginosa, yanıklar veya HIV/AIDS ve kanser gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar gibi daha önce hasar görmüş dokularda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir mikroorganizmadır. Ektima gangrenozum, jakuzi folikülit, malign otitis eksterna, osteomyelit gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir ve ayrıca kistik fibrozuslu hastalarda tedavisi zor pnömoniye neden olur. *P. aeruginosa*, biyofilmler, mukoid ekzopolisakkarit kapsüller, adhezinler ve çeşitli enzimler ve toksinler dahil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. Ayrıca, özellikle konak hücrelerine toksin enjeksiyonunda etkili olan bir tip III salgılama sistemine sahiptir. Bu virülans faktörleri onları canlı tutar ve yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli hale getirir (20).

P. aeruginosa, tıbbi laboratuvarlarda gözlemlenen en dirençli mikroorganizmalardan biridir. Dış zarının düşük geçirgenliği, çeşitli çoklu ilaç eflüks pompaları, çeşitli β -laktamazlar ve aminoglikozid değiştirici enzimler gibi çeşitli mekanizmalar bu dirençten sorumludur. Ayrıca, mutasyonlar ve/veya direnç genlerinin transferi yoluyla yeni antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilir. Metallo-beta-laktamaz üretenler gibi bazı suşların kolistin hariç tüm antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilmiştir (21).

Serratia marcescens

Serratia marcescens (*S. marcescens*), *Yersiniaceae* ailesi içerisinde yer alan *Serratia* cinsine ait bir türdür. İlk kez 1819 yılında tanımlanmış olup, başlangıçta patojenik olmayan bir mikroorganizma olarak değerlendirilmiş; ancak daha sonra fırsatçı bir patojen olarak tanımlanmıştır. Günümüzde hem insanlarda hem hayvanlarda hem de böceklerde çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojen olarak kabul edilmektedir.

Klinik örneklerin tamamından izole edilebilmekle birlikte, en sık solunum yolu örneklerinden elde edilmektedir. Doğal olarak su, toprak, bitkiler, hayvanlar ve böcekler gibi çeşitli çevresel kaynaklarda da bulunabilir (19).

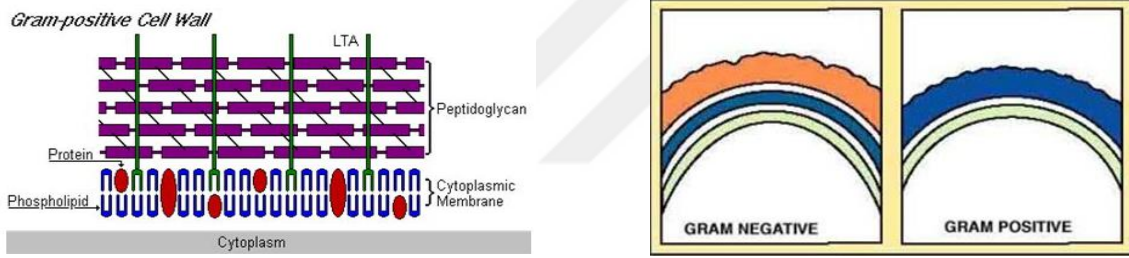
Biyokimyasal özellikleri açısından *S. marcescens*; oksidaz, indol ve metil red testlerinde negatif; Voges-Proskauer, sitrat, lizin dekarboksilaz, DNaz ve lipaz testlerinde ise pozitif sonuç verir. Ayrıca bazı biyotipleri karakteristik olarak kırmızı pigment (prodigiosin) üretir. Gram-negatif ve hareketli basildir. Klinik açıdan değerlendirildiğinde; menenjit, idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni ve diğer alt solunum yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, yara enfeksiyonları ve merkezi sinir sistemi hastalıkları gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (19).

Serratia türleri arasında antibiyotik direnci en sık *S. marcescens*'te gözlemlenmektedir. Bu tür, genellikle ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, ampisilin-sulbaktam, dar spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler ve nitrofurantoine karşı doğal direnç göstermektedir (29).

2.1.2 Gram pozitif bakteriler

Gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilerden farklı olarak dış membranları yoktur, fakat onları dış ortamdan koruyan çok daha kalın peptidoglikan tabakaları vardır (Şekil 2). Ayrıca gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan teikoik asit, gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkarit yapısına benzer şekilde kolonizasyonu etkilemektedir.

Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ÇİD’li gram pozitif bakterilere karşı etkili yeni antibakteriyel ajan arayışları devam etmektedir (30)



Şekil 2: Gram pozitif bakteri hücre duvar yapısı(18)

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) hareketsiz, sporsuz, katalaz ve koagülaz pozitif olan gram pozitif koktur. % 5 Koyun kanlı agar (KKA) da yuvarlak, düzgün kenarlı, 1-4 mm çapında altın sarısı veya kirli beyaz koloniler oluştururlar. Koloniler etrafında beta hemoliz zonu yaparlar. Gram boyamada tekli, kısa zincir yapmış veya

küme (üzüm salkımı gibi) yapmış gram pozitif koklar görülür. Sıcaklık ve çevre koşullarına dayanıklıdır, 50 C°'de 30 dakika dayanabilir, kuruluğa dirençlidirler, yüksek NaCl derişimlerinde (% 9) üreyebilirler, kültürlerde +4 C°' de ve oda sıcaklığında aylarca canlı kalırlar. Doğada yaygın olan bu bakteri insan ve hayvanların deri, mukoza ve diğer vücut bölgelerinde kommensal olarak bulunabilir (19). Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), biyofilm oluşturma kapasitesi ile bilinen ve bu özelliği nedeniyle kronik ve persistan enfeksiyonların gelişimine katkıda bulunan önemli bir patojendir. Ancak bir çok vakada kommensal olarak bulunan *S. aureus* suşunun endojen enfeksiyona neden olduğu görülmüştür (31).

S. aureus, yumuşak doku enfeksiyonları (fronkül, karbonkül, selülit vs), pnömoni, endokardit, artrit, sepsis gibi çok çeşitli klinik enfeksiyonlara neden olur. Aynı zamanda gıda kaynaklı hastalıkların en sık etkenlerinden biri olan bakteridir (19). Klinik olarak *S. aureus* ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde çoklu antibiyotik sınıflarına direnç görülmektedir. Antibiyotiklere karşı hızlı direnç geliştirme özelliğine sahip olan *S. aureus*'larda 1920'li yıllarda sülfonamid grubu antibiyotiklere, 1950'li yıllarda penisilin dahil çoklu ilaca ve 1960'lı yıllarda metisiline karşı direnç varlığı bildirilmiştir (32). *S. aureus*'ta metisilin direnci, SCCmec (SCC, Staphylococcal Casette Chromosome; mec, metisilin direncine neden olan genetik eleman) tarafından kodlanan penisilin bağlayan proteinlerin mutasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu direnç, bakteriler arasında transdüksiyon yoluyla aktarılmaktadır (31). MRSA suşları sadece β -laktam grubu antibiyotiklere değil aynı zamanda aminoglikozidler, tetrasiklinler, kinolonlar, makrolidler ve linkozamidlere de dirençlidirler. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan vankomisine karşıda direnç geliştiği bildirilmektedir (33)

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*); hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob gram pozitif koktur . KKA da non hemolitik, bazen alfa hemolitik düzgün kenarlı(S tipi) koloni yaparlar. *E. faecalis* % 40 safrada ve % 6.5 NaCl çözeltisinde üreyebilir. Eskülini hidroliz eder ve PYR testi (+) pozitifdir. Normal barsak florasında, kadın genital sisteminde, ağızda bulunurlar. Enterokoklar, hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın etkenlerinden biridir ve enterokokkal enfeksiyonların yaklaşık %85–90’ından *E.faecalis* sorumludur. Bu enfeksiyonların çoğu endojen kaynaklı olup yara enfeksiyonları, intraabdominal apseler, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları ve sepsis gibi çok çeşitli klinik tablolara yol açabilmektedir (21).

Enterokoklar; penisilinaz dirençli (antistafilokoksik) penisilinlere, sefalosporinlere, monobaktamlara ve trimetoprim-sülfametoksazole (TMP-SXT) karşı doğal direnç göstermektedir. Ayrıca aminoglikozidlere ve klindamisine karşı düşük düzeyde doğal dirençlidirler. Bununla birlikte, yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta-laktam direnci ve glikopeptid direncini (özellikle vankomisine dirençli enterokoklar – VRE) kazanabilmektedirler (34).

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) sporsuz, katalaz pozitif, hareketsiz, koagülaz negatif ve fakültatif anaerobik gram pozitif koktur. *S. epidermidis*, deri, solunum sistemi ve gastrointestinal sistem florasının doğal bir üyesidir (21). Ancak, aynı zamanda hastane enfeksiyonlarının da önde gelen etkenlerindendir ve uygunsuz şekilde alınmış kan kültürü örneklerinde sıklıkla kontaminant olarak bulunur. Tıbbi implantasyon ve kateterizasyon gibi enstrümantasyon prosedürleri ve ayrıca immünosüpresif ilaçlar, hastane kaynaklı *S.*

epidermidis enfeksiyonu için en önemli risk faktörleridir. *S. epidermidis*'in neden olduğu hastane enfeksiyonlarından bazıları; protez kalp kapakçıklarını içeren endokardit, yerleşik vasküler kateterlerle bağlantılı bakteriyemi, serebrospinal sıvı şantlarıyla ilişkili enfeksiyonlar, ameliyat sonrası göz enfeksiyonları, protez eklem enfeksiyonları, vasküler greft enfeksiyonları ve yoğun bakımda yenidoğan sepsisidir. *S. epidermidis*'in biyofilm geliştirme yeteneği kritik bir virülans faktörüdür. Bu, bakterinin abiyotik ve biyotik yüzeylere tutunmasını ve antibiyotiklere ve konak bağışıklık sistemine direnmesini sağlar (35).

2.2 Biyofilm

Biyofilm kavramı ilk kez 1971 yılında Marshall ve arkadaşları tarafından ortaya konmuş, ardından Fletcher, Characklis ve Costerton tarafından daha ayrıntılı biçimde tanımlanmıştır. Bu tanımda biyofilm, kolonizasyon sürecinde planktonik bakteri hücrelerine belirli avantajlar, karakteristik özellikler ve daha yüksek düzeyde organizasyon sağlayan; mikroorganizmaların yaşam döngüsündeki özgün bir büyüme modeli olarak ifade edilmiştir. Daha sonra Flemming ve Wuertz tarafından tanım çok daha netleştirilmiş ve biyofilmler; hücre bölünmesiyle küçük kümeler, mikrokoloniler ve daha büyük agregatlar oluşturan, belirgin şekilde yerleşik hücre gruplarını içeren mikrobiyal topluluklar olarak açıklanmıştır (36). Biyofilmler, mikroorganizmaların çevresel koşullara adaptasyonlarını ve metabolik işlevlerini sürdürebilmelerini sağlayan yapılar olarak, pek çok biyoteknolojik uygulamada önemli roller üstlenmektedir. Özellikle biyoyakıt üretimi, atık su arıtımı ve içme suyunun filtrelenmesi gibi süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler, hem çevresel sürdürülebilirliği teşvik etmekte hem de enerji ve su kaynaklarının daha verimli yönetilmesine katkı sağlamaktadır. Biyofilmin olumsuz etkileri arasında biyolojik kirlenme, korozyon ve içme suyu kalitesinin bozulması yer alır (37). İnsanlar da dahil olmak üzere tüm yüksek ökaryotlar, biyofilm oluşturan mikroorganizmalar tarafından kuşatılmıştır. İnsan dış plağı, derisi ve bağırsağı, ökaryotik habitatlardaki baskın

biyofilmlerden birini temsil eder. Tıbbi cihazların yaygın olarak kullanımı, bakteriyel biyofilm oluşumları için birçok yeni odak meydana getirmektedir (38).

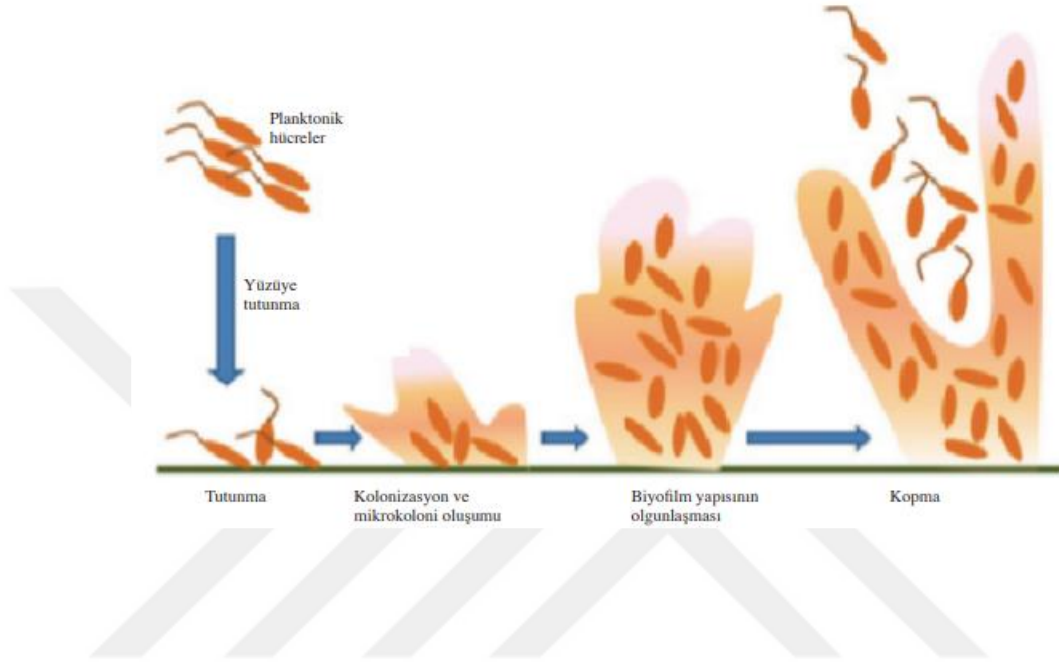
Biyofilm oluşumu, dört aşamalı dinamik bir süreçtir (Şekil 3).

-İlk aşama, planktonik yapıda mikroorganizmalar, canlı veya cansız yüzeye zayıf etkileşimlerle (hidrofobik, Van der Waals ve elektrostatik etkileşimler vb.) geri dönüşümlü olarak tutunur.

-İkinci aşama, mikroorganizmalar kamçı ve pili, ekstraselüler polimerik madde (EPS), lipopolisakkaritler, kolajen bağlayıcı proteinler gibi daha güçlü etkileşimler yoluyla geri dönüşümsüz olarak yüzeye bağlanır.

-Üçüncü aşama, yüzeye tutunan bakteri hücreleri bölünerek çoğalır ve mikrokoloniler oluşturur. Farklı tipte mikroorganizma toplulukları içeren biyofilm yapılarında, her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Su ve besin maddelerinin difüzyonu bu mikrokoloniler arasındaki kanallar aracılığıyla sağlanır. Kolonizasyon, çevredeki planktonik bakterilerin mikrokolonilere yapışmasıyla desteklenir. Bakteri popülasyonu yeni oluşan mikrokolonilerle gittikçe büyür. Bakterilerin etraflarındaki popülasyon yoğunluğunu algılamasını sağlayan Quorum Sensing (QS) sinyal sistemi devreye girer. Sinyal moleküllerinden oluşan bu sistem, hücreler arası iletişimi sağlar ve bakteri hücresindeki spesifik genlerin ifadesini etkileyerek olgun, üç boyutlu bir biyofilm yapısının oluşumunu destekler. Bu aşama aynı zamanda biyofilm fenotipinin ortaya çıkmaya başladığı aşamadır ve mikroorganizmanın dirençli bir yapı kazanmasıyla sonuçlanabilir.

-Dördüncü ve son aşamada ise mikroorganizmalar, iç veya dış etkenlere bağlı olarak kümeler halinde veya tek tek biyofilmden ayrılarak diğer hedef yüzeylerde kolonize olabilirler (39).



Şekil 3. Biyofilm oluşum basamakları (39)

Canlı veya cansız yüzeyler üzerinde oluşabilen mikrobiyal biyofilmler, vücudun hemen hemen her organında, tedavisi son derece zor olan enfeksiyonlara neden olabilirler. Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar arasında sepsis, yabancı cisim (protez, implant, kateter vb.), yumuşak doku (diyabetik ayak ülseri, bası yarası vb.) ve ürogenital sistem enfeksiyonları bulunur. Kronik enfeksiyonların çoğu, ÇİD’li mikroorganizmaların neden olduğu biyofilmlerden kaynaklanıyorsa da, duyarlı bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin de antimikrobiyallerle tedavisi oldukça zordur (40).

Biyofilmler, EPS, proteinler, lipitler, polisakkaritler ve hücre dışı DNA(eDNA)’ dan oluşur ve çok sayıda mikrobiyal enfeksiyonun patogeneğinde

önemli bir işlev görür (41). Hücreleri bağlayan EPS ile çevrili olduğundan, biyofilmdeki hücreler zorlu büyüme koşullarında hayatta kalırlar; UV, metal toksisitesi, asit maruziyeti, kuruma, pH gradyanları vb. etkenlere karşı direnç gösterirler. Çeşitli fiziksel ve kimyasal toleranslara ek olarak, EPS, nötrofil aracılı fagositozu inhibe ederek, biyofilmler içindeki birçok yerleşik patojenik mikroorganizmaya, bağışıklığa karşı direnç kazandırır (42). EPS içerisindeki eDNA ve hücreler arası adezinler, çeşitli antimikrobiyallerin penetrasyonuna karşı bariyer görevi görmektedir. Ayrıca EPS içinde bulunan eDNA, insan antimikrobiyal peptitlerini (AMP'ler) şelatlar ve bu peptitlerin antimikrobiyal aktivitesini azaltır (43).

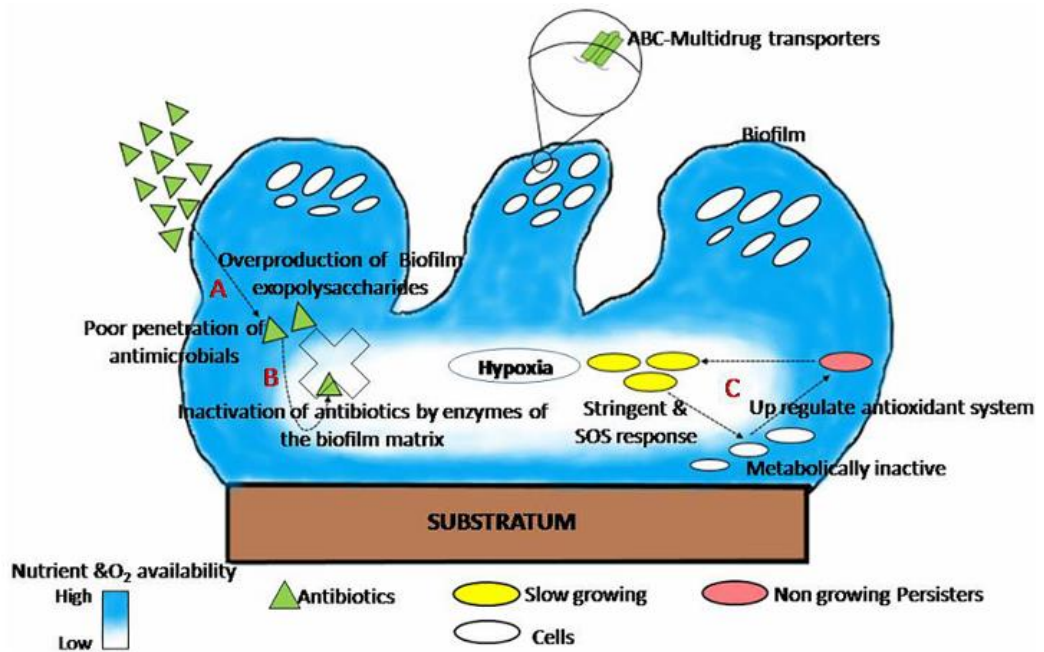
Şimdiye kadar, biyofilm oluşumuna bağlı ilaç direnci başta olmak üzere, zorlukların üstesinden gelmek için biyofilm oluşturma yöntemini ve müteakip önleyici stratejileri belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Glikokaliks, dış zar yapısı ve akış pompalarının varlığı ve biyofilm içindeki hücrelerin büyüme hızı, genetik adaptasyonu, metabolik durumu ve metabolizmasındaki heterojenlik, antimikrobiyallere karşı direnç kazanan biyofilmin önde gelen nedenleridir (44). Çeşitli insan patojenlerinde, biyofilm oluşum şekli ve ilaç direnç mekanizması, farklı araştırmacılar tarafından araştırılmış ve şematize edilmiştir (Şekil 4).

Biyofilm toleransının ortak mekanizmasını üç bölüm altında açıklamaktadır;

(1) Fiziksel tolerans: EPS'nin aşırı üretimi, antimikrobiyallerin penetrasyonunu ve difüzyonunu kısıtlar; bunun sonucunda biyofilmdeki hücreler toleranslı hale gelmek için daha fazla zamana sahip olur. Bu nedenle, EPS'yi destabilize eden ve inhibe eden terapötik stratejiler, biyofilmleri inhibe etmek ve önemli antimikrobiyal direnç problemlerini azaltmak için en iyi anti-biyofilm yaklaşımlarıdır. Yapılan bazı çalışmalarda EPS inhibisyonunun, biyofilmlerde hücre adezyonunu ve ilaç toleransını azalttığı gözlenmiştir.

(2) Pasif tolerans: biyofilm matriksinde bulunan enzimler antimikrobiyal molekülleri etkisiz hale getirir.

(3) Fizyolojik tolerans: biyofilmin daha derin katmanlarındaki metabolik olarak aktif olmayan hücreler, biyofilmlerin çeşitli antimikrobiyallere toleransını düzenleyen adaptif stres tepkileri gösterirler. Açlık, ekolojik faktörler ve SOS yanıt gibi çeşitli adaptif tepkiler tarafından tetiklenen fenotipik ve geri dönüşümlü değişikliklerden sonra, kalıcı hücreler çeşitli antibiyotiklere karşı daha toleranslı hale gelir.



Şekil 4: Çeşitli antimikrobiyallere karşı biyofilm toleransının genel mekanizması. (A) Fiziksel tolerans: biyofilm matrisi antimikrobiyallerin difüzyonunu sınırlar (B) Pasif tolerans: matris enzimleri nüfuz eden antibiyotik moleküllerini etkisizleştirir (C) Fizyolojik tolerans: biyofilmin daha derin katmanındaki kalıcı hücreler adaptif SOS tepkisini tetikler ve böylece daha toleranslı hale gelir (44).

Kalıcı hücreler yavaş bölünen bakterilerdir, antibiyotiklere daha az duyarlıdır ve biyofilmin yeniden kurulması için önemli bir role sahiptirler. Kalıcı hücreler, translasyonu engelleyen çeşitli toksin-antitoksin genlerinin ekspresyonunu

artırır, bu da hücrel metabolizmayı azaltır ve sonunda antibiyotiklerin varlığında hayatta kalmalarını sağlar. Bu hücreler, antibiyotik etkisinin sona ermesinden sonra enfeksiyonu tekrarlamak için vejetatif, bölünen hücrelere yeniden canlanır. Kalıcı hücreler, antibiyotiklerden uzak tutulmuştur. Çünkü bu hücreler toksin-antitoksin sistemini eksprese eder ve hedef antibiyotik, toksin modülü tarafından kilitlenir (44).

Biyofilmlerdeki oksijen eksikliği ve düşük metabolik aktivite, mikroorganizmaları birçok antibiyotiğe karşı daha toleranslı hale getirir. Katmanlar arasında ani pH değişiklikleri, organik asitlerin birikmesine ve dolayısıyla nüfuz eden bileşiklerin etkisiz hale gelmesine neden olur. Biyofilmin her yerinde oksijen, pH, besin ve elektron alıcılarının gradyanlarının gelişimi, hücrelerin gen ifadelerini değiştirerek yanıt verdiği mikro ortamlar oluşturur (45). Birçok türden oluşan kompleks (polimikrobiyal) biyofilm, genellikle tek bir türden oluşan biyofilme göre antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (46).

Biyofilmlerin antibiyotik toleransında en önemli rolü, hücre çeşitliliği ve metabolik koşullar oynamaktadır. Ancak dizileme teknolojisindeki ilerlemelerle birlikte elde edilen çok sayıda genomik veri, biyofilm oluşumu ile ilaç direnci arasındaki ilişkide bilinmeyen moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Örneğin RNAseq transkriptom analizi ile *E. faecalis* biyofilm oluşumu ve ilaç direnci ile ilişkili arsenik direnci operon genlerini (*arsR* ve *arsD*), sporülasyon düzenleyici geni (*paiA*), ABC ilaç taşıyıcı sınıflarını ve penisilin bağlayıcı proteinleri tanımlanmıştır (47).

2.3. Tıbbi Bitkilerin Tarihsel Kullanımı

İnsanların varoluşlarından bu yana, bitkileri çeşitli amaçlarla kullandıkları bilinmektedir. Örneğin, ilk çağlardan kalma arkeolojik bulgular, insanların bitkileri beslenme ve tedavi amaçlı kullandığını göstermektedir. Bunun kanıtı olarak, literatürde sıkça rastlanan Kuzey Irak'taki Şanidar Mağarası'nda 1957-1961 yılları arasında yapılan kazılarda ortaya çıkarılan Neandertal insanlarına ait mezar kalıntıları gösterilmektedir (48). Bir şamana ait olduğu düşünülen ve yaklaşık 60 bin yıllık olduğuna inanılan bu kalıntılarda, günümüzde hala tedavi amaçlı tüketilen peygamber çiçeği, hatmi, ambrosia, efedra, mor sümbül, civanperçemi gibi bitkilerin bulunduğu tespit edilmiştir (49). Ebers Papirüsü, ilaçların elde edildiği bitkiler hakkında en eski yazılı belgelerden biridir. MÖ 1550'de yazılan bu papirüste yaklaşık 700 bitkisel ve hayvansal ilahtan bahsedilmektedir (50). Botanik biliminin temellerini atan kişi olarak kabul edilen Theophrastus (MÖ 370-287), eğrelti otunun etkilerini bildiren ilk hekimidir (13). Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından yazılan kitaplarda 300 ila 400 bitki türünden bahsedilmektedir. Dioscorides tarafından milattan sonraki ilk yıllarda yazılan "De Materia Medica" adlı kitap, 600'den fazla tıbbi bitkiyi içermektedir ve modern farmakopeler için bir ön hazırlık olarak kabul edilebilir (51). Tıp bilgini Ebu Reyhan Biruni (973-1051), Kitâbü's-Saydana Fi't-Tıb adlı kitabında yaklaşık 200 bitkisel ilacı tanımlamıştır (13). Arap asıllı bir hekim olan Ziyaeddin İbn Baytar, Anadolu'yu gezmiş ve Baytarname adlı eserinde yaklaşık 1800 bitkisel ve 130 hayvansal ilacı tanımlamıştır (52).

Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımının antik çağlardan beri artarak devam ettiği görülmektedir. Mezopotamya uygarlığı bu amaçla yaklaşık 250 bitki türünü kullanırken, Yunan uygarlığı için bu sayının 600 olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar tarafından bitkisel tedavide yaklaşık 4.000 bitkinin kullanıldığı, Arap-Fars uygarlıklarında çok daha yüksek oranlara ulaştığı ve bu sayının 19. yüzyıldan itibaren 13.000'e ulaştığı bildirilmektedir (49).

Ülkemiz zengin bitki çeşitliliği, yaklaşık 10.000 tür nedeniyle büyük fitocoğrafik öneme sahiptir. Orta ve Doğu Anadolu, Batı ve Güney Anadolu ve Kuzey Anadolu Bölgesi olmak üzere üç flora bölgesine ayrılan ülkemiz, birçok türün gen merkezi olduğundan dolayı, ulusal ve uluslararası çalışmalar için büyük bir bitki rezervine sahiptir (53). Anadolu coğrafyasında, bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı Hitit Medeniyeti'ne kadar uzanmaktadır. Bu dönemde bazı bitkilerin (safran, mazi, kitre ve haşhaş vb.) bitkilerin tıbbi amaçlı yetiştirildiği, hatta bu amaçla ticaretinin bile yapıldığına dair veriler bulunmaktadır (54).

Türk bilgin İbn Sina (Avicenna) 785 bitkisel, hayvansal ve mineral ilacın hazırlanması ve kullanımı hakkında yazmıştır. Tarihte, Fatih Sultan Mehmet'in hocası olan Ak Şemseddin'in bir hekim olduğu ve tıbbi bitkilere karşı detaylı bir ilgi duyduğu kayıtlıdır (50). Bitkiler eski çağlardan beri hastalık tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır ve ilerleyen çalışmalar bitkilerin kimyasal içeriği ve biyolojik aktivitelerine odaklanmıştır. Antibiyotiklerin keşfedilmesi ile birlikte, patojen mikroorganizmaları tamamen yok edeceği iddiası, bitkilerin antimikrobiyal olarak kullanımını sınırlandırmıştır. Ancak zamanla patojen mikroorganizmalarda antibiyotik direnci geliştikçe araştırmacılar tekrar bitkilere yönelmiştir. Son yıllarda bitkilerle yapılan geleneksel tedavi yöntemleri tekrar gündeme gelmiş ve oldukça popüler olmuştur (48).

2.4. Bitkilerin Antimikrobiyal Önemi

Bitkiler farklı ülkelerde etkili ve güçlü ilaç kaynakları olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin kök, gövde, yaprak ve tohumları çeşitli tıbbi özelliklerinden dolayı geniş bir yelpazede ilaçların ham maddesi olarak kullanılmaktadır. Ancak çok sayıda bitkinin potansiyeli hala büyük ölçüde keşfedilmemiştir (50).

Bitkilerin kendilerini çeşitli patojenlere karşı korumak için antimikrobiyal ajanlar da dahil olmak üzere farklı bileşikler sentezlediği bilinmektedir. Tıbbi bitkiler, yapılarındaki; flavonoidler, fenolikler, kinonlar, alkaloidler, terpenoidler ve poliasetilenler gibi sekonder metabolitler ile yüksek fitokimyasal potansiyaline sahiptirler. Polifenoller, terpenik bileşikler, organik asitler ve vitaminler en yaygın olarak ortaya çıkan fitokimyasal gruplardır (55). Farklı iklim koşullarında yetişen aynı bitki türlerinin farklı antimikrobiyal aktivitelere sahip olması, bitkilerin yaşadıkları ortama uyum sağlamak için sentezledikleri farklı sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır (56). Fenolik bileşikler, fenolik asitler, karotenoidler, terpenoidler, alkaloidler, glikozitler ve sekonder metabolitler olan yağlar gibi doğal bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir (57).

Tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktların kimyasal bileşimi, birçok faktörden etkilenmektedir. Bitkinin coğrafi konumu, hasat zamanı ve kullanılan kısmı (yaprak, kök, meyve vb.), ekstraktın bileşimini önemli ölçüde değiştirebilir. Ayrıca, ekstraksiyon işlemi kullanılan solvent türü ve oranı da belirleyici faktörler arasındadır. Solventin polaritesi, ekstrakte edilen bileşenlerin türünü ve miktarını doğrudan etkiler. Etanol, metanol ve etil asetat gibi polar çözücüler, genellikle fenolik bileşenler ve flavonoidler açısından zengin ekstraktlar üretirken, hekzan gibi apolar solventler daha çok lipofilik bileşikler (uçucu yağlar ve terpenler) çözer. Bununla birlikte, ekstraksiyon sıcaklığı, süresi, solvent-bitki materyali oranı ve ortam pH'ı gibi değişkenler de ekstraktın kimyasal yapısını şekillendiren önemli etkenlerdir. Bu parametrelerdeki değişiklikler, ekstraktın antimikrobiyal, antioksidan ve diğer farmakolojik özellikleri üzerinde doğrudan etkili olabilir (58-60).

1926'dan beri bitkilerin mikroorganizmalara karşı inhibe edici özellikleri, özellikle insan sağlığı için önemli oldukları için, dünya çapında laboratuvar koşullarında araştırılmaktadır. Günlük yaşamda geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan tıbbi bitki denemeleri artık gözlem ve deneysel yöntemlerle yürütülmektedir (61). Antibiyotiklerin zararlarını azaltmak ve ilaca dirençli mikroorganizmaların

neden olduğu enfeksiyonları ortadan kaldırmak için yeni kemoterapötik alternatifler aranmaya başlanmıştır.

On dokuzuncu yüzyıldan bu yana, bazı baharatların, otların ve bileşenlerin antimikrobiyal özellikleri, dünya çapındaki araştırmacılar tarafından yapılan bilimsel deneylerle belgelenmiştir. Potansiyel ilaç kaynakları olarak kabul edilen bileşikler yüksek terapötik değere sahiptir ve geleneksel ve hatta modern tıbbın kaynağı olmuştur (62).

Son yıllarda, Türkiye'de çeşitli bitki özlerinin birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. İnsan patojenlerinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle, bitkiler de dahil olmak üzere doğal kaynaklardan yeni antimikrobiyal ajanlar arama ihtiyacı doğmuştur.

2.5 Çalışmada Kullanılan Tıbbi Bitkiler

2.5.1 *Cotinus coggygia* Scop. (duman ağacı)

Cotinus coggygia scop. bitkisi *Anacardiaceae* ailesinin bir üyesidir. Türkiye'de boyacı sumağı, duman ağacı, ruj çalısı ve peruk ağacı olarak da bilinir. (63) Kışın yapraklarını döken, 4-5 metreye kadar uzayabilen, sık dallı, yuvarlak tepeli bir ağaç veya çalıdır. Farklı pH değerlerine uyum sağladığı için her türlü toprak ve arazide geniş bir şekilde yayılabilir. Yaprakları ilkbaharda yeşildir ve yaz sonuna doğru turuncu-kırmızıya döner. Mart-Nisan aylarında çiçek açar. Çiçekleri küçük, pamuksu ve gösterişsizdir (Şekil 5). *C. coggygia* Scop. metanol ekstratının kimyasal analizi, ana bileşiklerinin tanenler, flavonoidler, glikozitler ve fenolik bileşikler olduğunu göstermiştir. Yaprakları farklı ülkelerde antiseptik, ateş düşürücü, iltihap giderici, kanamayı önleyici, antimikrobiyal ve yara tedavisinde kullanılmaktadır (15).

Ağacından ve köklerinden elde edilen sarı-turuncu boya kumaş boyamada kullanılır. Ayrıca sonbaharda yaprakları güzel bir kırmızı renge dönüştüğü için peyzaj amaçlı da önerilir. Güney Avrupa'dan Çin'e kadar geniş bir coğrafi dağılım alanına sahiptir. Türkiye'de Akdeniz, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgelerindeki makilik alanlarda ve kızılçam ormanlarında yaygın olarak bulunur (64).

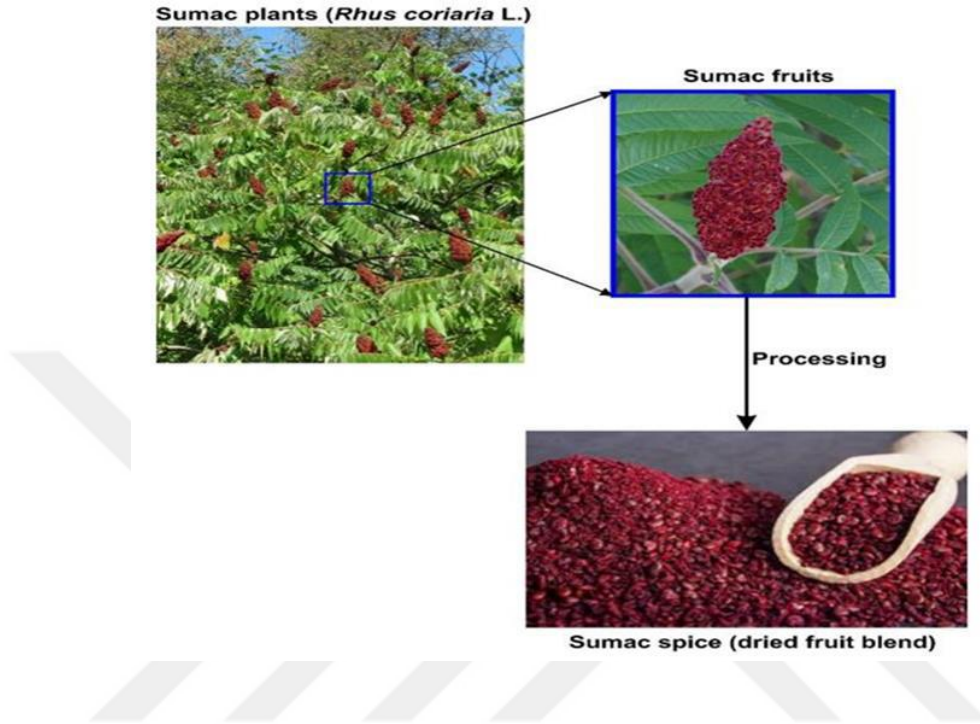


Şekil 5: *Cotinus coggygria* Scop. bitkisi (65)

2.5.2. *Rhus coriaria* L.(sumak)

Rhus coriaria L. bitkisi *Anacardiaceae* familyasına ait "sumak" olarak bilinen bir çalıdır (Şekil 6). Bu aileye ait bitkiler, dünya genelinde tarımsal kapasiteye sahip, ılıman ve tropikal bölgelerde yetişir ve yerli halk tarafından tıbbi ve diğer amaçlar için uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Türkiye, Afganistan ve İran gibi Orta Doğu ülkelerinde, İspanya ve Güney İtalya'da yaygın olarak kullanılır. Türkiye'de, Güneydoğu Anadolu bölgesinde daha yaygın olarak yetişir ve kullanılır. Yaygın olarak, Ortadoğu ve türk mutfağında baharat olarak kullanılmaktadır (66). Yapılan çalışmalar, *R. coriaria* L. bitkisinin, hidrolize edilebilir tanenler (esas olarak gallotanin), antosiyaninler, gallik asit türevleri, flavonoidler, terpenler, malik ve sitrik asitler gibi çeşitli organik asitler, yağ asitleri, ve vitaminler açısından zengin bir kaynak olduğunu göstermiştir (16). İçerdiği fitokimyasallara bağlı olarak, *R. coriaria*

bitkisi; antispazmodik, antiseptik, antihepatoksik, antidiyareik, antiviral ve antibakteriyel özelliklere sahiptir (16).



Şekil 6: Sumak bitkisi ve baharat ürünü (67)

2.6 Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, uygun koşullar altında (pH, bakteri sayısı, sıcaklık vb.), belirli bir mikroorganizma türüne karşı, belirli bir antimikrobiyal ajanın *in vitro* etkinliğini belirlemek için yapılan testlerdir. Bu testlerin sonuçları, patojen mikroorganizmalara karşı, etkili ilaçların seçilmesinde ve olası ilaç direncinin saptanmasında değerlidir (68).

Testlerde genellikle katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (KAMHB) veya Mueller-Hinton agar (MHA) kullanılması tavsiye edilmektedir. Dünya genelinde, antimikrobiyal testleri standartize eden, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) standartları yaygın olarak kullanılmaktadır (69). Doğru sonuçlar elde edebilmek için, CLSI ve EUCAST tarafından standardize edilen, antibakteriyel duyarlılık test yöntemlerinin yayınlandığı kılavuzlara uyulmalıdır.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan yöntemler, başlıca iki grupta incelenmektedir: difüzyon esaslı yöntemler ve dilüsyon esaslı yöntemler.

A-Difüzyon Yöntemleri

Difüzyon yöntemleri, antimikrobiyal ajanın katı besiyerinde difüze olarak mikroorganizma üzerindeki inhibitör etkisinin zon çapı ölçümleriyle değerlendirilmesine dayanmaktadır. Bu grupta en sık kullanılan yöntemler şunlardır:

-Disk Difüzyon Testi (Kirby-Bauer Yöntemi): Standart inokulumun Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılması ve antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesiyle uygulanır. İnkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zonu çapları CLSI veya EUCAST kriterlerine göre yorumlanır.

-Agar Difüzyon Yöntemi: Antimikrobiyal ajanların doğrudan agar ortamına difüze olması sağlanarak büyüme inhibisyonu değerlendirilir.

-*Gradyent Strip Test (Epsilometre Yöntemi)*: Farklı konsantrasyonları içeren antibiyotik şeritlerinin agar üzerine uygulanmasıyla minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değeri doğrudan gözlemlenir (70).

B- Dilüsyon Yöntemleri

Dilüsyon yöntemleri, antimikrobiyal maddenin sıvı besiyeri içerisinde seri şekilde seyreltilmesi ve mikroorganizmanın bu ortamda çoğalma yetisinin değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır. İki temel dilüsyon yöntemi bulunur:

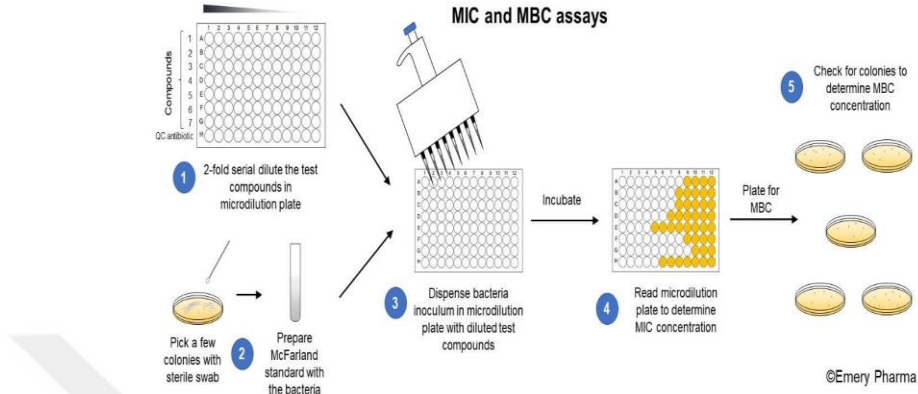
-*Mikrodilüsyon Yöntemi*: Mikroplak formatında uygulanır ve genellikle otomasyon sistemleriyle desteklenir. MIK değeri, görünür çoğalmanın engellendiği en düşük konsantrasyon olarak belirlenir.

-*Makrodilüsyon Yöntemi*: Tüp formatında manuel olarak gerçekleştirilir. Hem MIK hem de gerekiyorsa minimum bakterisid konsantrasyon (MBK) tayininde referans yöntem olarak kullanılır (70).

2.6.1 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, MIK değerlerinin belirlenmesinde kullanılan uluslararası referans yöntemidir. Bu testte Müeller-Hinton broth (MHB), en çok tercih edilen besiyeridir. Antimikrobiyallerin seri dilüsyonu 96 kuyulu mikroplakalarda gerçekleştirilir, belirli miktarda bakteri süspansiyonu eklenir ve inkübasyona bırakılır (Şekil 7). İnkübasyonun sonunda, kuyulardaki mikroorganizmaların *in vitro*

çoğalmasını engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MİK olarak kabul edilir (71).



Şekil 7: Mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK'nun belirlenmesi (72).

Hiçbir üremenin gözlenmediği, bakterilerin %99,9'unu öldüren en düşük antibakteriyel madde konsantrasyonu ise MBK değeri olarak kabul edilir. Test için, hiçbir üremenin gözlenmediği mikropkaya kuyularından katı besiyerine ekim yapılır. İnkübasyondan sonra bakteri üremesi izlenmeyen en düşük değer MBK olarak kabul edilir (73).

2.7 Biyofilm Oluşumunu Saptama Yöntemleri

Biyofilm oluşumunun saptanması, biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarla mücadele etmek ve bu enfeksiyonların önlenmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu amaç doğrultusunda biyofilm çalışmalarında çeşitli *in vitro* yöntemlerin yanı sıra deney hayvanlarında uygulanan *in vivo* tekniklerden de yararlanılmaktadır.

A-Fenotipik Yöntemler

a) *Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi*: Biyofilm oluşturma potansiyeli araştırılan bakteriler, sukroz, beyin kalp infüzyon buyyonu, Kongo kırmızısı ve agar içeren özel bir besiyerine inokule edilir. Ardından 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler renklerine göre değerlendirilir. Bu görsel farklılık, biyofilm üretim kapasitesini fenotipik olarak ayırt etmeyi mümkün kılar (39).

b) *Standart Cam Tüp Yöntemi*: Bu yöntem kapsamında, bakteri suşları Tryptic Soy Broth (TSB) içeren cam tüplere inokule edilir. Tüpler, 37 °C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun ardından tüp içeriği boşaltılır ve tüplere metilen mavisi ilave edilir. Belirli bir süre bekletildikten sonra boya da boşaltılarak değerlendirme yapılır. Tüpün iç yüzeyinde gözlemlenen boyalı tabaka, biyofilm oluşumunun pozitif göstergesi olarak kabul edilir (39)

c) *Modifiye Tüp Aderans Yöntemi (Christensen Yöntemi)*: Bu yöntemde, glikoz içeren TSB besiyeri ile doldurulmuş cam tüplere bakteriyel inokulasyon yapılır. Tüpler, 37 °C’de 24-48 saat süreyle inkübe edilir. Ardından tüp içeriği boşaltılır ve tüpler fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanır. Sonrasında tüplere Trypan Blue, Safranin veya Kristal Viyole gibi boyalardan biri eklenir. Bekletme süresi sonunda tüp içeriği boşaltılarak, tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilip kurumaya bırakılır. Tüpün iç yüzeyinde gözlemlenen renkli tabaka, biyofilm oluşumunun pozitif bir göstergesi olarak değerlendirilir. Ayrıca bu tabakanın renk yoğunluğu ve kalınlığına göre bakteriyel suşların biyofilm oluşturma kapasiteleri “çok güçlü”, “güçlü” ve “zayıf” şeklinde derecelendirilebilir (39).

d) *Mikroplak Temelli Biyofilm Değerlendirme Yöntemi*: Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan ve uygulaması kolay olan bu fenotipik

yöntem, genellikle 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalaklar aracılığıyla gerçekleştirilir. Her bir kuyucuğa belirli hacimde glikoz içeren sıvı besiyeri (örneğin beyin-kalp infüzyon buyyon veya TSB) ve bakteri süspansiyonu inokule edilir. Mikropalaklar uygun koşullarda, genellikle 37 °C’de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda mikropalaklar ters çevrilerek içerikleri boşaltılır ve PBS gibi uygun bir yıkama solüsyonuyla yıkanır. Bu işlemle biyofilm oluşturmayan planktonik hücreler ortamdan uzaklaştırılır. Ardından kuyucuklara boya maddesi (Kristal Viyole, Safranin veya Trypan Blue) ilave edilir ve belli süre bekletilir. Bu aşamada, mikropalak yüzeyine tutunmuş biyofilm tabakası boyanır. Boya fazlası boşaltılıp yeni bir yıkama işlemi yapılır; bu yıkama, biyofilme zarar vermemek adına dikkatle gerçekleştirilmelidir. Sonrasında mikropalaklar oda sıcaklığında kurutulur. Kuruyan kuyucuklara etanol, asetik asit veya aseton gibi çözücü ajanlar eklenerek biyofilm miktarının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi sağlanır. Elde edilen optik dansite (OD) değerlerine göre biyofilm varlığı ve seviyesi “yüksek”, “orta” ve “düşük” şeklinde sınıflandırılabilir (39).

Biyofilm Boyama Yöntemleri

-Kristal Viyole ile Boyama: Biyofilm biyokütlesinin varlığını ve miktarını belirlemek amacıyla kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, biyofilm yapısındaki bakteriler ve ekstraselüler matriksin negatif yüklü molekülleri, bazik özellikteki kristal viyole boyası ile boyanır. Boyama işleminin ardından bir çözücü (örneğin etanol veya asetik asit) eklenir; çözünmüş boya miktarı spektrofotometrik olarak değerlendirilir (74).

-Safranin ile Boyama: Kristal viyoleye kıyasla daha az toksik olan safranin boyası tercih edilebilir. Non-toksik yapısı nedeniyle daha güvenlidir .

-1,9-Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) Yöntemi: Özellikle *Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan biyofilmin ölçümünde kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Katyonik özellikteki DMMB boyası, biyolojik örneklerdeki glikozaminoglikanları (GAG) saptamak amacıyla yaygın olarak kullanılır. *S. aureus* biyofilminin ekstraselüler matriksindeki interselüler polisakkarit adezinler, GAG'lara yapısal olarak benzediği için DMMB ile boyanabilir. Boyama sonrası çözücü eklenerek biyofilm miktarı spektrofotometrik analizle değerlendirilir (74).

-Floresein Diasetat (FDA) Yöntemi: FDA; hücre membranına nüfuz eden, başlangıçta renksiz olan bir boyadır. Bakteri hücreleri tarafından alındığında, hücresel esterazlar yardımıyla sarı renkli floresans veren floreseine dönüştürülür. Oluşan floresans sinyali spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölü hücreler FDA'yı metabolize edemediği için floresans üretmezler. Bu yöntem özellikle *Candida albicans* biyofilm ölçümlerinde kullanılmaktadır (74).

-Ölü/Canlı Bakteri Boyama Yöntemi (LIVE/DEAD BacLight Boyama Kiti): Bu yöntem, bakterilerin canlılık durumlarını ayırt etmek amacıyla iki farklı nükleik asit boyasının kullanıldığı floresan temelli bir tekniktir.

Syto9: Yeşil floresans verir. Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin sağlam hücre membranlarından geçerek DNA'ya bağlanır.

Propidyum-iodid: Kırmızı floresans verir. Yalnızca membranı hasar görmüş hücrelere geçiş yapabilir ve DNA ile etkileşime girer.

Boyama işlemi sonrasında örnekler floresan mikroskopla değerlendirilir. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı renkte görünür (74).

B- Metabolik Yöntemler

a) *Resazurin Yöntemi*: Alamar Mavisi olarak da bilinen Resazurin, canlı hücrelere zarar vermeyen bir biyolojik boyadır. Floresan özelliği bulunmayan mavi renkli resazurin, hücresel metabolik aktivite sonucunda pembe floresans veren rezorufine dönüşür. Elde edilen floresans miktarı spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Resazurin, özellikle antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında canlı mikroorganizmanın varlığını saptamak ve biyofilm içindeki canlı hücre sayısını ölçmek amacıyla kullanılır (74).

b) *XTT Yöntemi*: Bu kolorimetrik yöntemde bir redoks indikatör olan XTT kullanılır. Canlı hücreler, solunumla ilgili metabolik aktiviteleri sonucunda 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfonil)-5[(fenilamino)karbonil] 2H-tetrazolyum hidroksit tuzunu suda çözünebilir turuncu renkli formazana indirger. İndirgenmiş XTT'nin süpernatanda oluşturduğu renk yoğunluğu, spektrofotometrik olarak ölçülerek biyofilmdeki canlı hücre miktarı tayin edilir (74).

c) *Bio Timer Yöntemi*: Biyofilm oluşturan canlı bakterilerin sayısının belirlenmesinde kullanılan kolorimetrik bir tekniktir. Bu yöntemde fenol kırmızısı içeren özgül bir belirteç kullanılır. Bakterilerin fermentatif metabolizması sonucunda oluşan asidik ürünler sayesinde belirtecin rengi kırmızıdan sarıya dönüşür. Renk değişiminin gerçekleştiği süre, başlangıçtaki bakteri konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir (74).

C- Moleküler Yöntemler

a) *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Gerçek Zamanlı Kantitatif-Revers Transkripsiyon PCR (qRT-PCR)*: PCR yöntemiyle, her bir bakteriyel türe özgü genetik diziler saptanabilir. Ancak yöntemin dezavantajları arasında şu hususlar yer alır:

- Kantitatif analiz yapılamaması,
- Hem canlı hem de ölü hücre DNA'larının amplifiye edilmesi nedeniyle canlı hücre ayrımının yapılamaması,
- Yüksek duyarlılık nedeniyle kontaminasyon kaynaklı yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesi.

Bu sınırlamaları aşmak amacıyla kullanılan Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkripsiyon PCR (qRT-PCR), canlı hücrelere özgü mRNA düzeylerini tespit eder. Bu teknik, amplifikasyon sırasında oluşan floresan sinyali her döngüde gerçek zamanlı olarak ölçer. Ölçülen sinyalin yoğunluğu, üretilen amplikon miktarıyla doğru orantılıdır. Böylece hem kantitatif hem de canlı hücreye özgü analiz yapılabilir. qRT-PCR, gen ekspresyon düzeylerinin izlenmesinde en güçlü ve en hassas yöntemlerden biridir (74).

b) *Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi*: FISH, floresan boyalarla işaretlenmiş özgül oligonükleotid probaların kullanıldığı bir moleküler tekniktir. Bu proplar, canlı hücrelerde bulunan ribozomal RNA (rRNA) ya da hedeflenen belirli moleküllere bağlanacak şekilde özel olarak tasarlanır. Biyofilm yapılarının çoğu zaman birden fazla bakteriyel tür içerdiği düşünüldüğünde, FISH yöntemi sayesinde bu türlerin varlığı ve dağılımı yüksek çözünürlükte görselleştirilebilir. Yöntem; mikroskopik incelemeye olanak sağlar, hücresel düzeyde özgüllük sunar ve canlı

hücreleri doğrudan hedef alır. Bu özellikleriyle, karmaşık biyofilm topluluklarının analizinde oldukça değerlidir (74).

D- Fiziksel Yöntemler

a) *Kütle Spektrometrisi (Mass Spectrometry)*: Kütle spektrometrisi; moleküllerin kimyasal yapılarının tanımlanmasında ve kantitatif analizinde kullanılan ileri düzey bir teknik olup, iyonlaştırılmış moleküllerin kütle/yük (m/z) oranına göre ayrıştırılması prensibine dayanır. Bu yöntemle elde edilen spektral veriler, analizi yapılan materyalin kimyasal yapısıyla doğrudan ilişkilidir. Hem kalitatif (nitel) hem de kantitatif (nicel) bilgi sunar. Ancak cihaz maliyeti yüksek olup analiz süreci zaman alıcıdır. Uygulama, deneyimli personel ile donanımlı laboratuvar koşulları gerektirir (74).

b) *Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy – CLSM) Yöntemi*: Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM), aydınlatma kaynağı olarak lazer ışınlarının kullanıldığı ileri düzey bir optik mikroskoptur. İncelenecek biyolojik numune, genellikle özgül floresan boyalarla işaretlenir. Mikroskop, X, Y ve Z eksenlerinde ardışık kesit görüntüleri alarak bu görüntüleri dijital ortamda birleştirir. Bu teknik, özellikle kalın biyolojik yapılar—örneğin mikrobiyal biyofilmler—için yüksek çözünürlüklü üç boyutlu görselleştirme imkânı sunar. CLSM, biyofilm morfolojisinin detaylı şekilde incelenmesine olanak tanıyarak mikrobiyolojik çalışmalar için kıymetli bir görsel analiz aracıdır (74).

c) *Konfokal Raman Mikroskop (Confocal Raman Microscopy – CRM) Yöntemi*: Konfokal Raman mikroskopi (CRM), Raman spektroskopisi ile konfokal görüntüleme teknolojisinin birleştirilmesiyle oluşan gelişmiş bir analiz yöntemidir. Raman spektroskopisi, belirli bir dalga boyunda elektromanyetik lazer ışını kullanılarak analiz

edilecek numuneye yöneltir. Numuneden saçılan ışınım ve buna bağlı enerji değişimi ölçülerek, numunenin kimyasal bileşimi hakkında detaylı bilgi elde edilir. Yöntem, biyolojik örneklerin moleküler düzeyde analizinde güçlü bir araçtır. Ancak kalın biyofilm tabakaları içinde derinlemesine araştırma yapmak bu teknikle sınırlı olabilir. Bu kısıtlamayı aşmak amacıyla Raman spektroskopisi ile konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) teknolojisinin entegre kullanımı önerilmektedir. Böylece hem kimyasal yapı hem de üç boyutlu morfolojik özellikler eş zamanlı olarak analiz edilebilir. CRM, özellikle karmaşık mikrobiyal biyofilm yapılarının detaylı olarak incelenmesinde avantaj sağlamaktadır (74)

d) *Elektron Mikroskobu (Electron Microscopy) Yöntemi*: Elektron mikroskobu yönteminde ışık kaynağı olarak fotonlar yerine elektronlar kullanılır. Analiz edilen numuneden saçılan elektronların algılanması esasına dayanan bu teknik, elektronların ışığa göre daha kısa dalga boyu ve yüksek enerjiye sahip olmaları nedeniyle, oldukça yüksek büyütme kapasitesi ve çözünürlük imkânı sunar. Bu özellikleri sayesinde elektron mikroskopları, standart optik mikroskoplara kıyasla çok daha ayrıntılı görüntüler elde edilmesini sağlar.

Elektron mikroskobisi iki temel alt yönteme ayrılır:

- *Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)*: Numunenin ultra ince dilimler hâlinde hazırlanmasını gerektirir. Biyofilmin iç yapısı, hücre içi organizasyon ve hücre altı detayların incelenmesinde son derece etkilidir.
- *Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)*: Numunenin yüzeyine yönlendirilen elektronların saçılmasıyla oluşturulan görüntüler üzerinden mikrokolonilerin morfolojisi değerlendirilir. Numune yüzeyindeki biyofilm tabakasının yapısı ve yerleşimi hakkında bilgi verir.

Her iki yöntem de biyofilm araştırmalarında detaylı yapısal inceleme olanağı sağlamaktadır. Bununla birlikte, uygulama süreçlerinde vakum ortamı, iletken kaplama ve numune hazırlama hassasiyetleri gibi teknik sınırlamalar göz önünde bulundurulmalıdır (74).

e) *X-Ray Mikroskobu (X-ray Microscopy)*: Bu yöntemde örnek, X-ışını bandındaki elektromanyetik radyasyonla aydınlatılmakta olup, yüksek çözünürlüklü biyolojik görüntüleme imkânı sunar. X-ray mikroskobu, hücresel yapıların ve biyolojik numunelerin detaylı biçimde incelenmesinde kullanılır. Ancak cihazın oldukça yüksek maliyeti ve karmaşık kullanım prosedürleri bu yöntemin başlıca dezavantajları arasındadır (74).

f) *Tarayıcı Uç Mikroskobu (Scanning Probe Microscopy, SPM)*: Bu mikroskopik görüntüleme tekniğinde, incelenen numunenin yüzeyi nanometrik boyutta bir prob aracılığıyla taranır ve topografik özellikleri üç boyutlu olarak tanımlanır. Tarayıcı uç mikroskobisi çatısı altında yer alan Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy, AFM), özellikle bakteri hücreleri ve biyofilm yapılarının incelenmesinde etkili bir teknolojidir (74).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizmalar

Çalışmada, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarın'da stok süt besiyerinde (Conda, İspanya) -80 C° de saklanan American Type Culture Collection (ATCC) suşları kullanıldı. Kullanılan mikroorganizmalar tablo 1' de görülmektedir.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

1. <i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
2. <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) ATCC 29213
3. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
4. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
5. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
6. <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
8. <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 179978
9. <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355
10. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100

3.2 Bitkisel Ekstraktlar

Cotinus coggygia Scop. ve *Rhus coriaria* L. türlerine ait bitki örnekleri, Artvin ili Yusufeli ilçesi sınırlarından toplanmış olup, botanik teşhisleri Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi'nden Prof. Dr. Özgür Eminağaoğlu tarafından gerçekleştirilmiştir. *Cotinus coggygia* Scop. türüne ait örnek Herbaryum'a No:12622, *Rhus coriaria* L.türüne ait örnek ise No:11342 numarasıyla depo edilmiştir.

Toplanan bitkilerin aerial kısımları kullanılarak, etil asetat ekstraktları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü bünyesindeki Doğal Ürünler Laboratuvarı'nda elde edilmiştir.

Çalışmada, ekstraktlar 400 mg/mL konsantrasyonunda dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon; minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve antibiyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere, 10 kat distile su ile seyreltilerek, 40 mg/mL konsantrasyonunda çalışma çözeltileri hazırlandı.

3.3 Besiyerleri

KKA besiyerleri (RTA, Türkiye) hazır formda temin edildi. EMB (Condalab, İspanya), KAMHB (BBL, Fransa) ve TSB (Condalab, İspanya) besiyerleri ise liyofilize formda temin edilerek üretici firma protokollerine uygun şekilde hazırlandı.

Bitkisel ekstraktların çözünürlüğünü artırmak ve bakteriyel büyümeyi desteklemek amacıyla KAMHB besiyerine %0,5 oranında Tween 80 eklendi.

Bakterilerin biyofilm formasyonunu teşvik etmek amacıyla ise TSB besiyeri, son konsantrasyonu %1 olacak şekilde glukoz ile zenginleştirildi.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan tüm besiyerleri, sıvı ve katı formlar dahil, 1 atm basınç altında, 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavlanarak (Nüve, Türkiye) steril hale getirildi.

Katı besiyerleri, otoklavlamadan sonra 55 °C’ye kadar soğutuldu; ardından petri plaklarına ortalama 4 mm kalınlığında dökülerek katılaştırıldı. Sıvı besiyerleri, hazırlanma işleminden sonra kullanılabilecek steril kapaklı tüplerde muhafaza edildi.

Tüm besiyerleri deney süresine kadar +4 °C’de, buzdolabı koşullarında saklandı.

3.4 Antimikrobiyal Çalışmalar

3.4.1 Mikroorganizmaların canlandırılması

Çalışma gününe kadar -80 °C’de saklanan stok ATCC kültürleri 37 °C’ lik etüvde (Nüve, Türkiye) 2 saat bekletildikten sonra bakteriler KKA ve EMB besiyerine pasajlandı. Pasajlanan besiyerleri 37 °C’lik etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Saf olmayan kültürlerden tekrar pasaj yapıldı ve işlem tekrarlandı.

3.4.2 Mikroorganizma Süspansiyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak mikroorganizmaların taze kültürlerinden, pamuk uçlu eküvyon (Microcult, Çin) yardımıyla birkaç koloni alınarak, serum fizyolojik içerisinde, densitometre cihazı (bioMérieux, Fransa) kullanılarak 0.5 McFarland (1×10^8 koloni oluşturan birim; KOB/mL) bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar, MİK ve MBK testleri için serum fizyolojik içerisinde 1/10; antibiyofilm çalışmaları için ise TSB besiyerleri içerisinde 1/100 oranında seyreltilti.

3.4.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

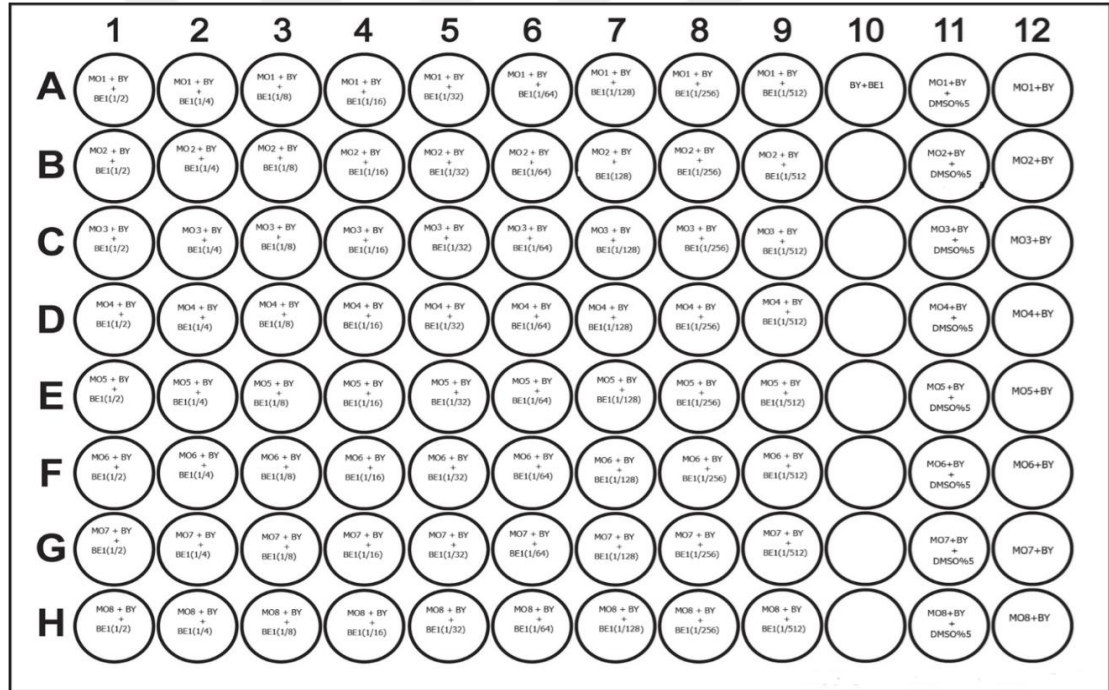
Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Bitki ekstraktlarının MİK ve MBK değerleri CLSI önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu U tabanlı steril mikroplakalar (NEST, Çin) kullanılarak belirlendi (71). Çalışmada, %0,5 Tween 80 ilave edilmiş KAMHB besiyeri kullanıldı. Hazırlanmış olan McFarland 0,5 yoğunlukta bakteri süspansiyonu serum fizyolojik içerisinde 1/10 oranında (1×10^7 KOB/ml) dilüe edildi.

Her iki bitkisel ekstrakt için ayrı mikroplakalar kullanılarak çalışma yürütüldü. Mikroplakalardaki her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri eklendi. Ardından, ilgili bitkisel ekstraktan ilk kuyucuğa 100 µL ilave edilerek pipetaj ile homojen karışım sağlandı. Elde edilen karışımdan 100 µL alınarak seri transfer yöntemiyle bir sonraki kuyucuğa aktarıldı ve bu işlem 9. kuyucuğa kadar tekrarlanarak iki katlı seri dilüsyon (1/2 – 1/512) hazırlandı. Son kuyucuktan alınan 100 µL atıldı. Dilüe edilmiş mikroorganizma

süspansiyonlarından her kuyucuğa 5 µL eklendi. Böylece, her kuyucuktaki nihai bakteri konsantrasyonu 5×10^5 KOB /mL düzeyine ayarlandı. Kuyucuklardaki, son ekstrakt konsantrasyonları sırasıyla 20mg/ml, 10mg /ml, 5mg /ml, 2.5mg /ml, 1.25mg /ml, 0.62mg/ml, 0.31mg /ml, 0.15mg /ml ve 0.07mg /mL oldu. Mikroplaka üzerinde; sterilit kontrolü (besiyeri+ekstrakt), çözücü kontrolü (besiyeri+bakteri+%5'lik DMSO) ve üreme kontrolü (besiyeri+bakteri) için birer kuyucuk kullanıldı (Şekil 8).

Mikroplakaların kapakları kapatılarak bakteriler 37°C'de, 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri üremesinin gözle görülmeyeceği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. Tüm çalışmalar 3 kez tekrarlandı.



Şekil 8: MİK'in değerlendirildiği mikroplağın şematik gösterimi (MO1:1.mikroorganizma, BY:besiyeri, BE1:1.bitkisel ekstrakt)

MBK tespiti için, MİK değerleri belirlendikten sonra mikroplaka üzerinde bakteri üremesi görülmeyen kuyucukların her birinden 10 µl alınarak birbirine karışmayacak şekilde KKA'a damlatma yolu ile ekim yapıldı ve 37°C de 18-24 saat inkübe edildi. KKA üzerinde bakterilerin %99,9'unu öldüren en küçük konsantrasyon MBK olarak tanımlandı.

3.4.4 Antibiyofilm Etkinlik çalışmaları

Antibiyofilm etkinlik analizlerinden önce, çalışmada kullanılan tüm bakteriyel suşların biyofilm oluşturma yetenekleri, mikrotitrasyon plaka yöntemi kullanılarak ve kristal viyole (CV) boyası ile kantitatif olarak değerlendirildi. Biyofilm gelişimini teşvik etmek amacıyla, %1 glukoz ilavesi yapılmış TSB besiyeri tercih edildi.

Yapılan ön değerlendirme çalışmaları sonucunda, altı bakteriyel referans suşunun ;*S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *S. aureus* (MSSA) ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. marcescens* ATCC 8100 , belirgin düzeyde biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu tespit edildi. Bu doğrultuda, bitkisel ekstraktların farklı konsantrasyonlarının antibiyofilm etkinliği, belirgin biyofilm üretme yeteneği gösteren bu altı bakteriyel suş üzerinde sistematik olarak değerlendirildi.

Biyofilm İnhibisyon Testi

Cotinus coggygia scop. ve *Rhus coriaria* L. bitki ekstraktlarının biyofilm inhibisyon testi 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklar (NEST, Çin) kullanılarak gerçekleştirildi. Taze kültürlerden serum fizyolojik içerisinde hazırlanan McFarland

0,5 yoğunlukta (1×10^8 KOB/ml) bakteri süspansiyonu, %1 glukoz ilaveli TSB besiyeri kullanılarak 1/100 oranında (1×10^6 KOB/ml), seyreltildi.

Mikroplakalardaki her bir kuyucuğa 100µl besiyeri ile hazırlanmış bakteri süspansiyondan pipetlendi. Bitkisel ekstraktan ilk kuyucuğa 100 µl ilave edilip, kuyucuk içerisinde pipetajla karıştırıldıktan sonra 100µL alınıp ikinci kuyucuğa, ikinci kuyucuktan üçüncü kuyucuğa aktararak 9. kuyucuğa kadar 2 kat dilüsyon (1/2-1/512) yapıldı. Son kuyucuktan alınan 100 µL atıldı.

Daha önce yapılan sıvı mikro dilüsyon testi ile belirlenen MİK değerlerine göre; MİK, 1/2MİK, 1/4MİK ve 1/8MİK kuyucuklarının içeriği yeni mikroplakaya aktarıldı. Mikroplaka üzerinde pozitif kontrol (besiyeri+bakteri+%5DMSO) ve negatif kontrol (besiyeri+%5DMSO) için kuyucuklar hazırlandı.

Mikroplakalar, 37 °C'de, 24 saat inkübe edildi. Isı ve nem dengesini bozmamak için mikrodilüsyon plakları üst üste dört adetten fazla konulmadı. İnkübasyon süresi sonunda mikroplakalardaki besiyerleri, oluşan biyofilm tabakasına zarar vermeden nazikçe boşaltıldı ve otomatik elisa yıkama cihazı (BioTek, ABD) ile distile su kullanılarak 3 kez yıkandı. Böylece planktonik mikroorganizmalar uzaklaştırıldı. Mikroplakalar ters çevrilip emici kağıt üzerinde kuruması beklendi.

Kuruyan mikroplakalara, 100 µL %99 konsantrasyonda metanol eklendi ve oda ısısında kapakları kapalı olarak 10 dakika bekletilerek biyofilm tabakası fiks edildi. Bekleme süresi sonunda mikroplakalardaki metanol boşaltılarak, plakların tamamen kuruması beklendi. Kuruyan kuyucuklara 100 µL %0,1 konsantrasyonda kristal viyole (MERCK, Almanya) eklendi ve 15 dakika boyanması beklendi. Boyama süresi sonunda tekrar otomatik elisa yıkama cihazında distile su ile 3 kez yıkama yapıldı ve plaklar oda ısısında kurutuldu. Spektrofotometrik okuma öncesi boyanan biyofilm

tabakası üzerine 100µL %96'lık etanol eklenerek plaklar en az 15 dk boyunca bekletildi. Boyanın homojenize olması için her kuyucuğa nazikçe pipetaj uygulandı. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için mikropalaklar, spektrofotometrik olarak elisa mikropalak okuma cihazı (BioTek, ABD) ile 570 nm dalga boyunda okutuldu. Test 3 kez tekrarlandı.

Her bir ekstrakt konsantrasyon kuyucuğu için; 3 testin OD sonuçlarının ortalaması (OD_{Test}), negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarının OD sonuçlarının ortalaması (OD_{NK} ve OD_{PK}) alınarak değerlendirilmede kullanıldı. Biyofilm inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{İnhibisyon(\%)} = [1 - (OD_{Test} - OD_{NK}) / OD_{PK} - OD_{NK}] \times 100$$

Biyofilm Eradikasyon Testi Uygulaması

Bu çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ve *Rhus coriaria* L. bitki ekstraktlarının biyofilm eradikasyon potansiyelleri, düz tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları kullanılarak incelendi. Her bir bakteri suşu için üçü test ve biri pozitif kontrol olacak şekilde toplam dört kuyucuk ayrıldı. Her kuyucuğa, %1 glukoz içeren TSB besiyeri ile 1/100 oranında seyreltilmiş bakteri süspansiyonundan 100 µL pipetlendi. Negatif kontrol amacıyla ise yalnızca besiyeri ve %5 DMSO içeren bir kuyucuk hazırlandı.

Mikropalaklar, 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, biyofilm oluşumuna zarar vermemek amacıyla kuyucuklardaki besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı, ardından distile su ile üç kez otomatik ELISA yıkama cihazı kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında mikropalaklar ters çevrilerek emici kağıt üzerine bırakılarak kurutuldu.

Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, sıvı mikro dilüsyon testinden elde edilen Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerine göre; MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında hazırlanan bitki ekstraktı çözeltilerinden 100 µL, biyofilm oluşturulan üç ayrı test kuyucuğuna uygulandı. Pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarına ise 100 µL %5 DMSO içeren besiyeri eklendi.

İkinci inkübasyon aşamasında mikroplakalar yeniden 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, biyofilm inhibisyon testinde uygulanan prosedür tekrar edildi ve mikroplakalar, 570 nm dalga boyunda ELISA mikroplak okuma cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Elde edilen veriler doğrultusunda biyofilm eradikasyon potansiyeli aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Eradikasyon (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{NK}}) / (\text{OD}_{\text{PK}} - \text{OD}_{\text{NK}})] \times 100$$

4.BULGULAR

4.1 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

Cotinus coggygia Scop. ve *Rhus coriaria* L. bitkisel ekstraktlarının antibakteriyel etkinliği, sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Çalışmada, toplum kaynaklı ve nazokomial enfeksiyonlarda sık karşılaşılan; *S.aureus* (MRSA) ATCC 43300, *S. aureus* (MSSA) ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E.coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 700603, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 179978, *E. cloacae* ATCC 23355 ve *S.marcescens* ATCC 8100 standart bakteri suşları kullanıldı. Bakteri üremesinin gözle görülmediği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi.

Bakteri üremesi görülmeyen kuyucukların her birinden 10µl alınarak birbirine karışmayacak şekilde KKA'a pipetlendi ve 37°C de 18-24 saat inkübe edildi. KKA üzerinde bakteri üremesi görülmeyen en küçük konsantrasyon MBK olarak tanımlandı.

4.1.1 *Cotinus coggygia* Scop. Etil Asetat Ekstraktı: Mikrodilüsyon Bulguları

Çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktı en güçlü antibakteriyel etkinliği 2,5 mg/mL MİK değeriyle *S. epidermidis*, *E. coli*, *A. baumannii* ve *S. marcescens* standart suşları üzerinde gösterdi. Buna karşılık, *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* (MSSA), *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. cloacae* suşları üzerinde daha düşük bir etki izlendi; bu suşlar için MİK değeri 5 mg/mL olarak tespit edildi (Tablo 2).

Ekstraktın MBK değerlendirmesinde ise en güçlü bakterisidal etki, 2,5 mg/mL MBK değeriyle *A. baumannii* suşu üzerinde belirlendi. *E. faecalis*, *S. epidermidis* ve *E. coli* suşları üzerinde daha düşük bakterisidal etki gözlemlenmiş olup, bu suşlar için MBK değeri 5 mg/mL olarak belirlendi. Diğer standart suşlar üzerinde gözlemlenen bakterisidal etki, 10 mg/mL düzeyindeki MBK değeri ile belirlenmiştir (Tablo 3).

MİK ve MBK değerleri, iki standart suşta birbirine eşit bulundu: *E. faecalis* için MİK ve MBK 5 mg/mL, *A. baumannii* için ise 2,5 mg/mL olarak belirlendi.

Tablo 2: *Cotinus coggyria* scop. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MİK

Bakteriler	Konsantrasyonlar								
	20mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	2,5mg/ml	1,25mg/ml	0,62mg/ml	0,31mg/ml	0,15mg/ml	0,07mg/ml
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 43300			MİK						
<i>S.aureus</i> (MSSA) ATCC 29213			MİK						
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212			MİK						
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228				MİK					
<i>E.coli</i> ATCC 25922				MİK					
<i>K.pneumonia</i> ATCC700603			MİK						
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853			MİK						
<i>A.baumannii</i> ATCC179978				MİK					
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355			MİK						
<i>S.marcescens</i> ATCC 8100				MİK					

Tablo 3: *Cotinus coggyria scop.* ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MBK

Bakteriler	Konsantrasyonlar								
	20mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	2,5mg/ml	1,25mg/ml	0,62mg/ml	0,31mg/ml	0,15mg/ml	0,07mg/ml
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 43300		MBK							
<i>S.aureus</i> (MSSA) ATCC 29213		MBK							
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212			MBK						
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228			MBK						
<i>E.coli</i> ATCC 25922			MBK						
<i>K.pneumonia</i> ATCC700603		MBK							
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853		MBK							
<i>A.baumannii</i> ATCC179978				MBK					
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355		MBK							
<i>S.marcescens</i> ATCC 8100		MBK							

4.1.2 *Rhus coriaria* L. Etil Asetat Ekstraktı: Mikrodilüsyon Bulguları

Çalışmada, *Rhus coriaria* L. ekstraktı en güçlü antibakteriyel etkinliği 0,62 mg/mL MİK değeriyle *S. aureus* (MRSA) ve *S. epidermidis* standart suşları üzerinde gösterdi. En zayıf antibakteriyel etki ise 5 mg/mL MİK değeriyle *E. faecalis* suşu üzerinde gözlemlendi. *S. aureus* (MSSA), *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarına karşı 1,25 mg/mL MİK değeriyle etkili olurken; *K. pneumoniae*, *E. cloacae*

ve *S. marcescens* suşları üzerinde 2,5 mg/mL MİK değeriyle antibakteriyel etki gösterdi (Tablo 4).

Ekstraktın MBK değerlendirmesinde en güçlü bakterisidal etki, 1,25 mg/mL MBK değeriyle *S. epidermidis* ve *A. baumannii* suşları üzerinde izlendi. En düşük bakterisidal etki ise *E. faecalis*, *E. cloacae* ve *S. marcescens* suşları üzerinde 5 mg/mL MBK değeriyle tespit edildi. Diğer suşlar üzerinde ise MBK değeri 2,5 mg/mL olarak belirlendi (Tablo 5).

Üç farklı standart suшта MİK ve MBK değerlerinin birbirine eşit olduğu gözlemlendi. Bu değerler *E. faecalis* için 5 mg/mL, *K. pneumoniae* için 2,5 mg/mL ve *A. baumannii* için 1,25 mg/mL olarak saptandı.

Tablo 4: *Rhus coriaria* L. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MİK

Bakteriler	Konsantrasyonlar								
	20mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	2,5mg/ml	1,25mg/ml	0,62mg/ml	0,31mg/ml	0,15mg/ml	0,07mg/ml
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 43300						MİK			
<i>S.aureus</i> (MSSA) ATCC 29213					MİK				
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212			MİK						
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228						MİK			
<i>E.coli</i> ATCC 25922					MİK				
<i>K.pneumonia</i> ATCC700603				MİK					
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853					MİK				
<i>A.baumannii</i> ATCC179978					MİK				
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355				MİK					
<i>S.marcescens</i> ATCC 8100				MİK					

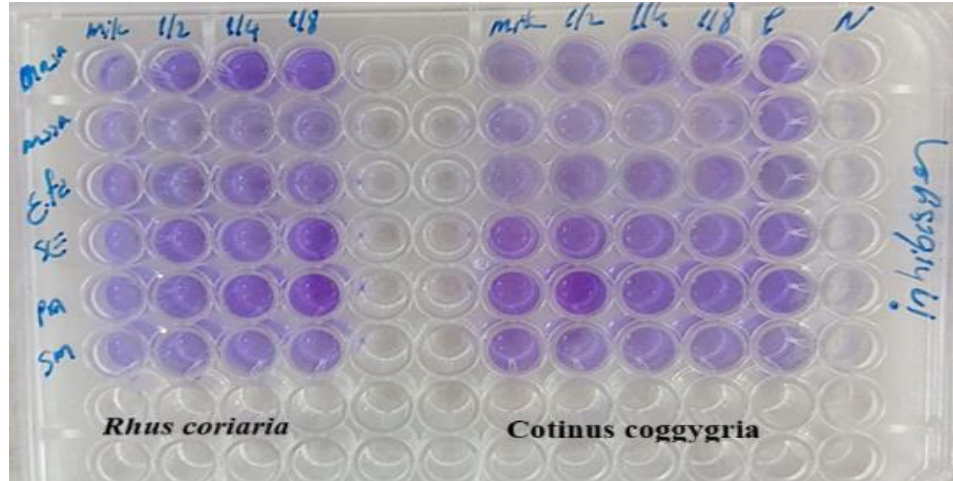
Tablo 5: *Rhus coriaria* L. ekstraktının sıvı mikrodilüsyon sonuçları-MBK

Bakteriler	Konsantrasyonlar								
	20mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	2,5mg/ml	1,25mg/ml	0,62mg/ml	0,31mg/ml	0,15mg/ml	0,07mg/ml
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 43300				MBK					
<i>S.aureus</i> (MSSA) ATCC 29213				MBK					
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212			MBK						
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228					MBK				
<i>E.coli</i> ATCC 25922				MBK					
<i>K.pneumonia</i> ATCC700603				MBK					
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853				MBK					
<i>A.baumannii</i> ATCC179978					MBK				
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355			MBK						
<i>S.marcescens</i> ATCC 8100			MBK						

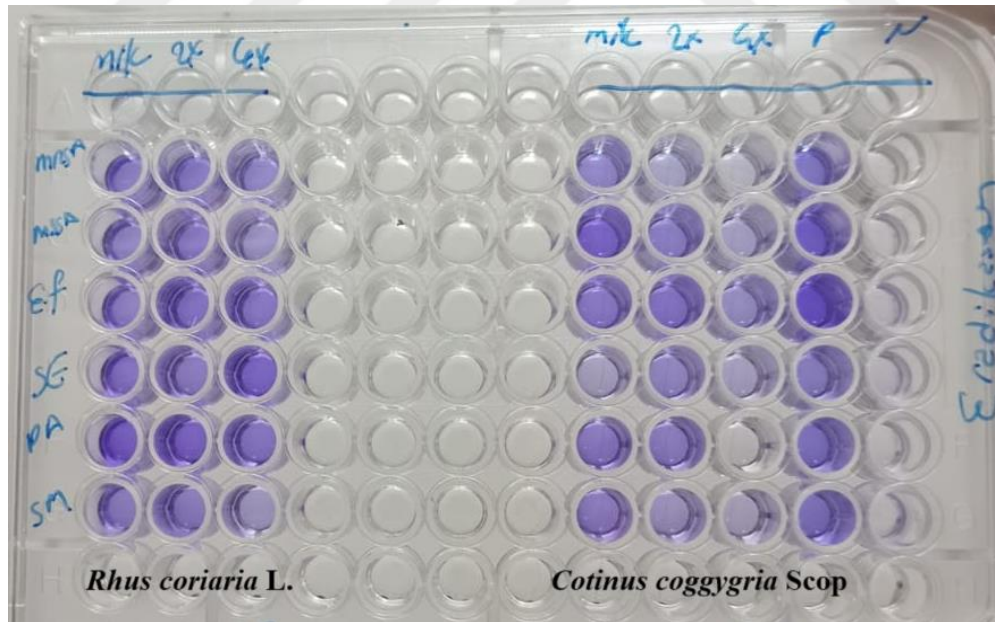
4.2 Antibiyofilm Etkinlik Değerlendirilmesi

Ekstraktların biyofilm inhibisyon potansiyeli, belirlenen MİK, 1/2MİK, 1/4MİK ve 1/8MİK konsantrasyonları kullanılarak değerlendirildi (Şekil 9). Ayrıca, biyofilm eradikasyon etkinliği, hazırlanan MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonları ile incelendi (Şekil 10).

Antibiyofilm potansiyelinin değerlendirilmesinde, ön test sonuçlarına göre belirgin biyofilm formasyonu sergileyen altı bakteriyel referans suş kullanıldı: *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *S. aureus* (MSSA) ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. marcescens* ATCC 8100 .



Şekil 9: *Rhus coriaria* L. ve *Cotinus coggygia* Scop. bitkisel ekstraktlarının antibiyofilik etkinlik çalışması (İnhibisyon)



Şekil: 10 *Rhus coriaria* L. ve *Cotinus coggygia* Scop. bitkisel ekstraktlarının antibiyofilik etkinlik çalışması (eradikasyon)

4.2.1 *Cotinus coggygia* Scop. Ekstraktının Biyofilm İnhibisyonu ve Eradikasyonuna Yönelik Deneysel Bulgular

Çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının biyofilm inhibisyon etkisi, altı farklı bakteri suşunda MİK, 1/2MİK, 1/4MİK ve 1/8MİK konsantrasyonlarında değerlendirildi. Her suş için pozitif kontrol ile karşılaştırmalı olarak optik dansite (OD) değerleri ölçüldü ve inhibisyon oranları hesaplandı (Tablo 6).

Tablo 6: *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının biyofilm İnhibisyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve inhibisyon yüzdeleri

	OD MİK	OD 1/2xMİK	OD 1/4xMİK	OD 1/8xMİK	OD Poz.Kont.
	İnh.%	İnh.%	İnh.%	İnh.%	
MRSA	0,347 (%38,97)	0,381 (%32,92)	0,417 (%26,59)	0,538 (%5,28)	0,568
MSSA	0,237 (%42,34)	0,252 (%38,44)	0,361 (%12,16)	0,372 (%9,48)	0,411
<i>E. faecalis</i>	0,285 (%47,39)	0,312 (%42,51)	0,328 (%39,56)	0,471 (%12,94)	0,541
<i>S. epidermidis</i>	0,632 (%11,21)	0,647 (%9,13)	0,654 (%8,14)	0,658 (%7,58)	0,712
<i>P.aeruginosa</i>	0,973 (%2,89)	1,204 (%0.00)	0,991 (%1,10)	0,996 (%0,60)	1,002
<i>S.marcescens</i>	0,490 (%14,64)	0,494 (%13,93)	0,549 (%4,36)	0,561 (%2,27)	0,574

S. aureus (MRSA) suşunda sırasıyla %38,97, %32,92, %26,59 ve %5,28 oranlarında inhibisyon gözlemlendi. Özellikle 1/8 MİK konsantrasyonunda inhibisyon oranında belirgin bir azalma kaydedildi.

S. aureus (MSSA) suşunda inhibisyon oranları %42,34, %38,44, %12,16 ve %9,48 olarak belirlendi. 1/4 MİK konsantrasyonundan itibaren inhibisyon etkisinde düşüş gözlemlendi.

E. faecalis suşunda %47,39, %42,51, %39,56 ve %12,94 oranlarında inhibisyon tespit edildi. Bu suşta, çalışmada elde edilen en yüksek inhibisyon oranları kaydedildi. 1/8 MİK düzeyinde inhibisyon etkisi belirgin olarak azaldı.

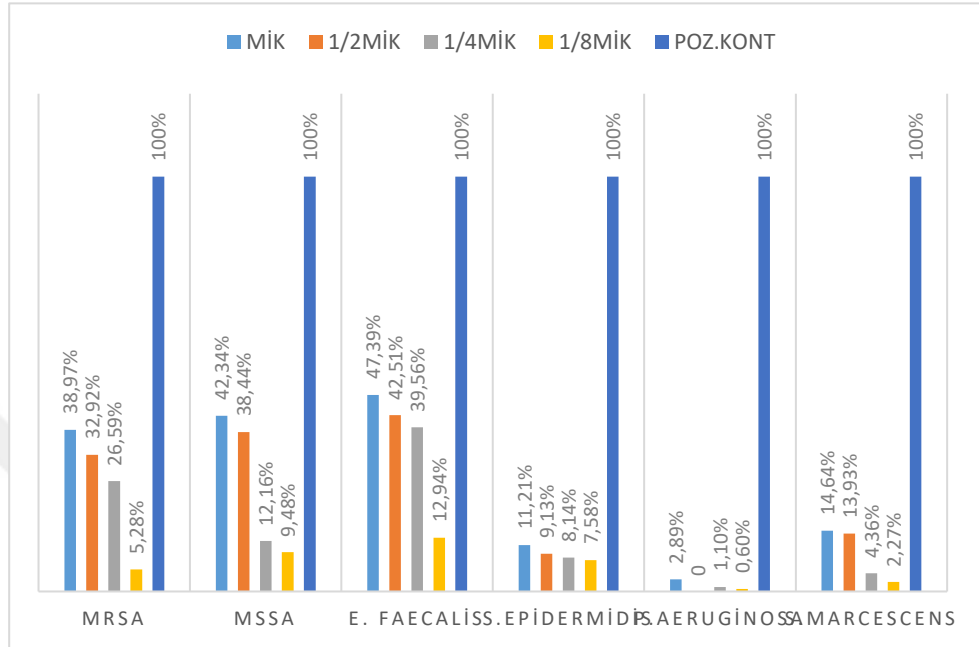
S. epidermidis suşunda inhibisyon oranları %11,21, %9,13, %8,14 ve %7,58 olarak hesaplandı. Bu değerler, diğer Gram pozitif suşlara kıyasla daha düşük bulundu.

P. aeruginosa suşunda biyofilm inhibisyon oranları sırasıyla %2,89, %0,00, %1,10 ve %0,60 olarak belirlendi. Bu değerler, çalışmada gözlemlenen en düşük inhibisyon oranlarıdır. Özellikle 1/2 MİK konsantrasyonunda inhibisyon etkisi tespit edilmedi.

S. marcescens suşunda sırasıyla %14,64, %13,93, %4,36 ve %2,27 oranlarında inhibisyon gözlemlendi (Şekil 11).

Bu bulgular, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının özellikle *E. faecalis*, MSSA ve MRSA suşlarında daha yüksek antibiyofilm etkiler gösterdiğini; *S. epidermidis*, *P.*

aeruginosa ve *S. marcescens* suşlarında ise etkinliğin sınırlı kaldığını ortaya koymaktadır.



Şekil 11: *Cotinus coggygia* Scop. bitkisel ekstraktının biyofilm inhibisyon sonuçları

Çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının biyofilm eradikasyon etkisi, altı farklı bakteri suşunda MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında değerlendirildi. Her suş için pozitif kontrol ile karşılaştırmalı olarak optik dansite (OD) değerleri ölçüldü ve eradikasyon oranları hesaplandı (Tablo 7).

Tablo 7: *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının biyofilm eradikasyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve eradikasyon yüzdeleri

	OD MİK	OD 2xMİK	OD 4xMİK	OD Poz.Kont.
	Erd.%	Erd..%	Erd.%	
MRSA	0,309 (%45,79)	0,288 (%49,47)	0,195 (%65,79)	0,570
MSSA	0,641 (%6,15)	0,594 (%13,03)	0,402 (%41,15)	0,683
<i>E. faecalis</i>	0,604 (%50,20)	0,582 (%52,03)	0,412 (%66,04)	1,213
<i>S. epidermidis</i>	0,297 (%49,15)	0,302 (%48,29)	0,274 (%53,08)	0,584
<i>P.aeruginosa</i>	0,523 (%1,32)	0,518 (%2,26)	0,089 (%83,21)	0,530
<i>S.marcescens</i>	0,354 (%37,78)	0,331 (%41,80)	0,279 (%50,97)	0,569

Cotinus coggygia Scop. ekstraktı farklı konsantrasyonlarda uygulandığında altı farklı bakteri suşunda biyofilm eradikasyonuna yönelik değişken düzeylerde etki göstermiştir.

S. aureus (MRSA) suşunda eradikasyon oranları MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında sırasıyla %45,79, %49,47 ve %65,79 olarak belirlendi. En yüksek eradikasyon 4MİK konsantrasyonunda gözlemlendi.

S. aureus (MSSA) suşunda eradikasyon oranları %6,15, %13,03 ve %41,15 olup, etkinlik özellikle 4MİK düzeyinde artış göstermiştir.

E. faecalis suşunda biyofilm eradikasyon oranları sırasıyla %50,20, %52,03 ve %66,04 olarak saptandı. Bu değerler, çalışmada test edilen bakteriyel suşlar arasında

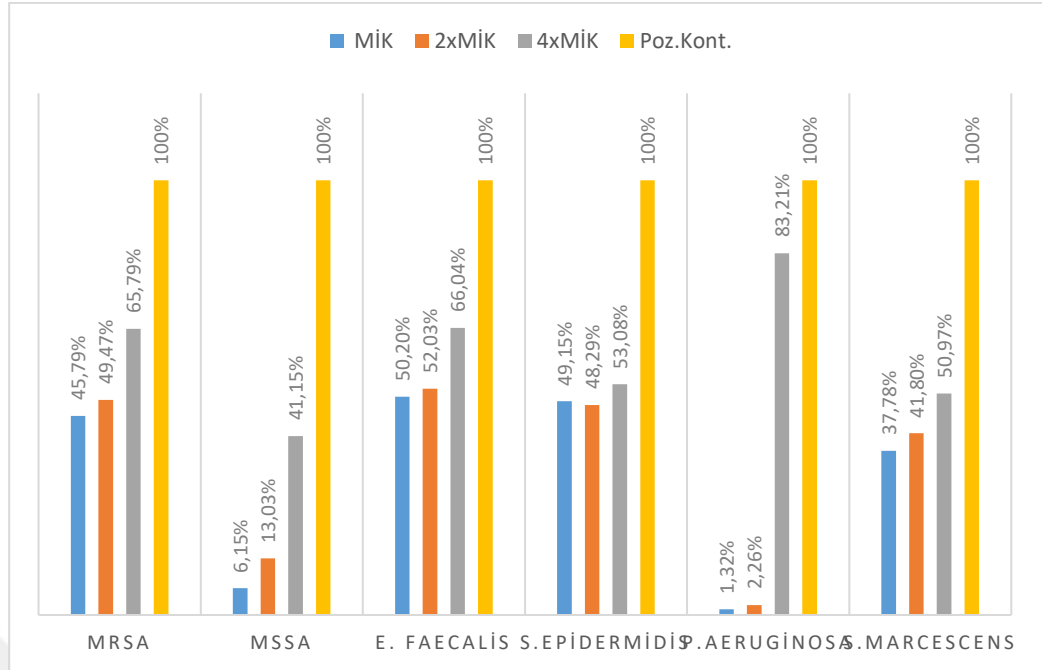
ekstraktın eradikasyon etkisine en yüksek duyarlılık gösteren türlerden biri olduğunu ortaya koymaktadır. En belirgin eradikasyon etkisi, 4MİK konsantrasyonunda gözlenmiş olup, bu düzeyde eradikasyon oranı %66,04'e ulaşmıştır.

S. epidermidis suşunda eradikasyon oranları sırasıyla %49,15, %48,29 ve %53,08 olup, MSSA hariç, diğer Gram pozitif suşlara benzer düzeydedir.

P. aeruginosa suşunda eradikasyon oranları %1,32, %2,26 ve %83,21 olarak belirlendi. Bu suшта yalnızca 4MİK konsantrasyonunda belirgin eradikasyon etkisi izlendi.

S. marcescens suşunda eradikasyon oranları %37,78, %41,80 ve %50,97 olup, Etkinlik konsantrasyonla birlikte artış tespit edildi (Şekil 12).

Genel olarak, *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktı *S. aureus* (MRSA), *E. faecalis*, *S. epidermidis* ve *S. marcescens* suşlarında daha yüksek eradikasyon etkisi gösterdi. *S. aureus* (MSSA) ve *P. aeruginosa* suşlarında ise yalnızca yüksek konsantrasyonda anlamlı etki gözlemlendi. Bu bulgular, ekstraktın biyofilm eradikasyon potansiyelinin suş ve doz bağımlı olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 12: *Cotinus coggygia* Scop. bitkisel ekstraktının biyofilm eradikasyon sonuçları

4.2.2 *Rhus coriaria* L. Ekstraktının Biyofilm İnhibisyonu ve Eradikasyonuna Yönelik Deneysel Bulgular

Çalışmada *Rhus coriaria* L. ekstraktının biyofilm inhibisyon etkisi, altı farklı bakteri suşunda MİK, 1/2MİK, 1/4MİK ve 1/8MİK konsantrasyonlarında değerlendirildi. Her suş için pozitif kontrol ile karşılaştırmalı olarak optik dansite (OD) değerleri ölçüldü ve inhibisyon oranları hesaplandı (Tablo 8).

Tablo 8: *Rhus coriaria* L. ekstraktının biyofilm İnhibisyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve inhibisyon yüzdeleri

	OD MİK	OD 1/2xMİK	OD 1/4xMİK	OD 1/8xMİK	OD Poz.Kont.
	İnh.%	İnh.%	İnh.%	İnh.%	
MRSA	0,387 (%31,10)	0,482 (%15,14)	0,528 (%7,04)	0,540 (%4,93)	0,568
MSSA	0,218 (%46,96)	0,221 (%46,23)	0,232 (%43,55)	0,236 (%42,59)	0,411
<i>E. faecalis</i>	0,461 (%14,78)	0,489 (%9,60)	0,504 (%6,83)	0,498 (%7,95)	0,541
<i>S. epidermidis</i>	0,488 (%31,46)	0,589 (%17,28)	0,615 (%13,61)	0,714 (%0,00)	0,712
<i>P.aeruginosa</i>	0,724 (%27,74)	0,957 (%4,49)	0,985 (%1,70)	1,004 (%0,00)	1,002
<i>S.marcescens</i>	0,371 (%35,34)	0,506 (%11,85)	0,521 (%9,24)	0,564 (%1,74)	0,574

S. aureus (MRSA) suşunda inhibisyon oranları MİK, 1/2MİK, 1/4MİK ve 1/8MİK konsantrasyonlarında sırasıyla %31,10, %15,14, %7,04 ve %4,93 olarak belirlendi. MİK konsantrasyonunda belirgin olan inhibisyon oranı, konsantrasyon azalmasına paralel olarak azaldı.

S. aureus (MSSA) suşunda inhibisyon oranları %46,96, %46,23, %43,55 ve %42,59 olup, tüm konsantrasyonlarda orta düzeyde etki gözlemlendi.

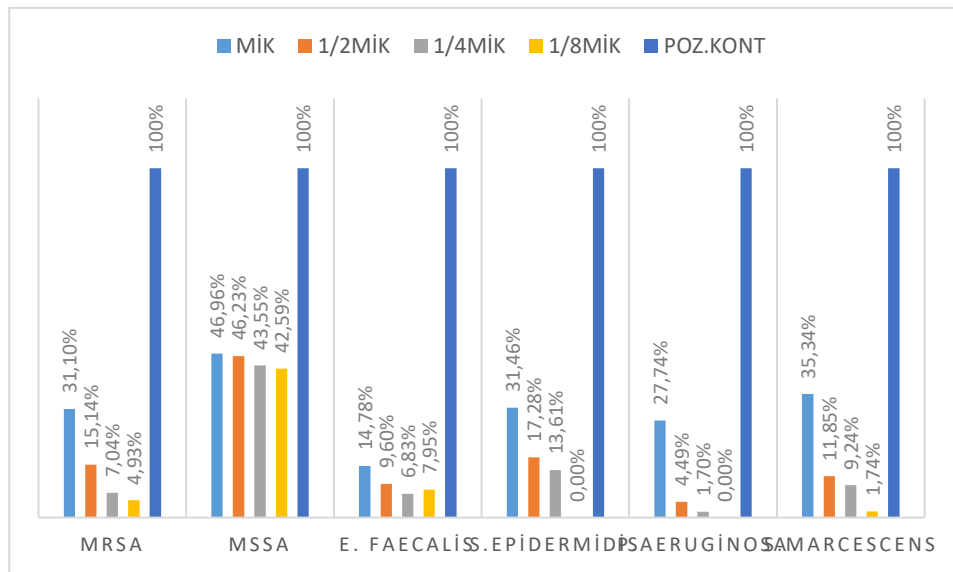
E. faecalis suşunda inhibisyon oranları %14,78, %9,60, %6,83 ve %7,95 olarak hesaplandı. MİK, 1/2MİK ve 1/8MİK konsantrasyonlarında etkinlik diğer Gram pozitif bakterilere göre daha zayıf olarak izlendi.

S. epidermidis suşunda inhibisyon oranları %31,46, %17,28, %13,61 ve %0,00 olup, etkinlik en düşük konsantrasyonda tesbit edilmedi.

P. aeruginosa suşunda inhibisyon oranları %27,74, %4,49, %1,70 ve %0,00 olarak belirlendi. MİK konsantrasyonu dışında etkinliğin oldukça azaldığı ve *S. Epidermidis*'de olduğu gibi 1/8 MİK konsantrasyonunda biyofilm inhibisyon aktivitesi göstermediği belirlendi.

S. marcescens suşunda inhibisyon oranları %35,34, %11,85, %9,24 ve %1,74 olup, etkinlik konsantrasyonla birlikte azalmıştır. *P. aeruginosa* 'ya benzer şekilde belirgin etki MİK konsantrasyonunda izlendi.

Genel olarak, *Rhus coriaria* L. ekstraktının inhibisyon etkisi, *S. aureus* (MSSA) suşunda orta düzeyde iken; *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis* ve *S. marcescens* suşlarında daha düşük, *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* suşlarında ise oldukça sınırlı düzeyde gözlemlendi(Şekil 13).



Şekil 13: *Rhus coriaria* L. bitkisel ekstraktının biyofilm inhibisyon sonuçları

Çalışmada *Rhus coriaria* L. ekstraktının biyofilm eradikasyon etkisi, altı farklı bakteri suşunda MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında değerlendirildi. Her suş için pozitif kontrol ile karşılaştırmalı olarak optik dansite (OD) değerleri ölçüldü ve eradikasyon oranları hesaplandı (Tablo 9).

Tablo 9: *Rhus coriaria* L. ekstraktının biyofilm eradikasyon çalışmasına ait optik dansiteler(OD) ve eradikasyon yüzdeleri

	OD MİK	OD 2xMİK	OD 4xMİK	OD Poz.Kont.
	Erd.%	Erd..%	Erd.%	
MRSA	0,557 (%2,28)	0,541 (%5,09)	0,538 (%5,61)	0,570
MSSA	0,637 (%6,73)	0,621 (%9,07)	0,517 (%24,31)	0,683
<i>E. faecalis</i>	0,919 (%24,24)	0,851 (%29,84)	0,741 (%38,93)	1,213
<i>S. epidermidis</i>	0,574 (%1,71)	0,581 (%0,51)	0,568 (%2,74)	0,584
<i>P.aeruginosa</i>	0,535 (%0,00)	0,528 (%0,38)	0,533 (%0,00)	0,530
<i>S.marcescens</i>	0,555 (%2,46)	0,538 (%5,45)	0,385 (%32,34)	0,569

Rhus coriaria L. ekstraktı, farklı konsantrasyonlarda uygulandığında altı farklı bakteri suşunda biyofilm eradikasyonuna yönelik sınırlı düzeyde etki gösterdi. Genel olarak, eradikasyon oranları düşük kaldı ve ekstraktın biyofilm yapılarının ortadan kaldırılmasında güçlü bir etkinlik sergilemediği gözlemlendi.

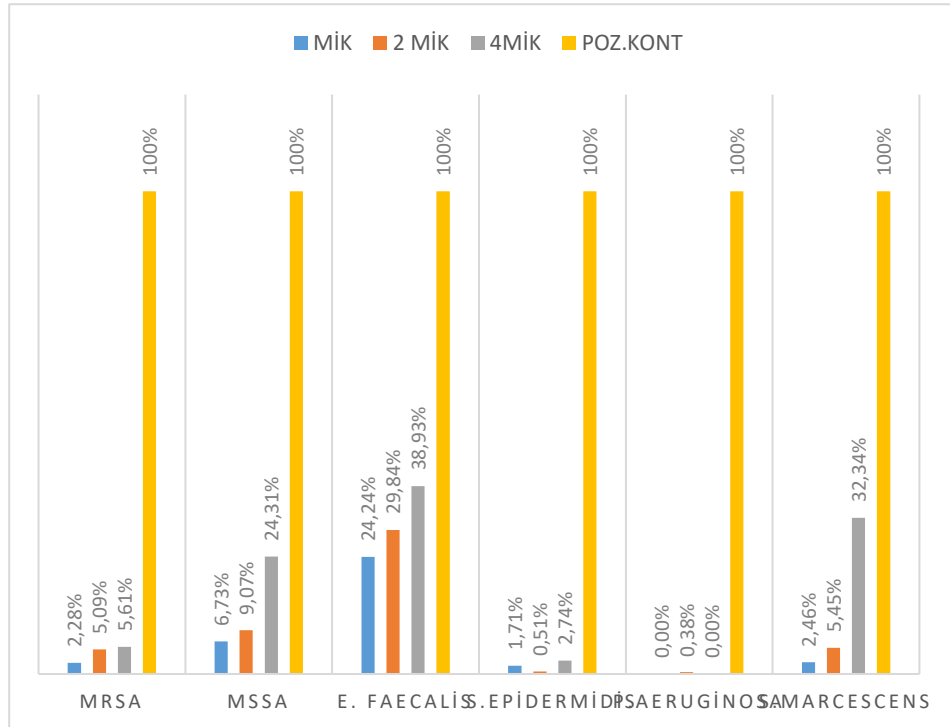
S. aureus (MRSA) suşunda eradikasyon oranları MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında sırasıyla %2,28, %5,09 ve %5,61 olarak belirlendi. *S. aureus* (MSSA) suşunda eradikasyon oranları %6,73, %9,07 ve %24,31 olup, etkinlik özellikle 4MİK düzeyinde artış gösterdi.

E. faecalis suşunda biyofilm eradikasyon oranları sırasıyla %24,24, %29,84 ve %38,93 olarak ölçüldü. Bu değerler, çalışmada değerlendirilen suşlar arasında *Rhus coriaria* L. ekstraktına karşı en belirgin eradikasyon yanıtı gösteren türlerden biri olduğunu ortaya koymaktadır.

S. epidermidis suşunda eradikasyon oranları %1,71, %0,51 ve %2,74 olup, tüm konsantrasyonlarda düşük düzeyde etki saptandı.

P. aeruginosa suşunda eradikasyon oranları %0,00, %0,38 ve %0,00 olarak ölçüldü; ekstraktın bu suş üzerinde eradikasyon etkisi göstermediği belirlendi.

S. marcescens suşunda eradikasyon oranları %2,46, %5,45 ve %32,34 olup, etkinlik konsantrasyonla birlikte artış gösterdi. (Şekil 14).



Şekil 14: *Rhus coriaria* L. bitkisel ekstraktının biyofilm eradikasyon sonuçları

5.TARTIŞMA

Antibiyotiklere dirençli patojenik mikroorganizmaların hızla yayılması ve mevcut antimikrobiyal ajanların çeşitli yan etkileri, yeni ve alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Özellikle bitki özlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması, bitkilerin doğal bileşenlerinin belirli düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiğinin ortaya konmasıyla, alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik kritik bir araştırma alanı olarak kabul edilmektedir (75). Yapılan çok sayıda bilimsel çalışma, tıbbi bitkilerin antibiyotik dirençli patojenlere karşı yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi açısından önemli bir kaynak teşkil ettiğini göstermektedir (76).

Bu çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktının *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 5 mg/mL ve 10 mg/mL olarak belirlendi, bu durum ekstraktın bakteriyostatik etkinliğini ortaya koymaktadır. Biyofilm inhibisyon oranları MİK ve alt konsantrasyonlarda %38,97 (5mg/mL) ile %5,28 (0,62mg/mL) arasında değişmiş; eradikasyon oranları ise MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında sırasıyla %45,79 (5mg/mL), %49,47 (10 mg/mL) ve %65,79 (20 mg/mL) olarak bulunmuştur. Bu bulgular, ekstraktın biyofilm oluşumunu baskılamada ve mevcut biyofilm yapılarını parçalamada doz bağımlı belirgin bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşunda ise MİK ve MBK değerleri MRSA ile benzer şekilde 5 mg/mL ve 10 mg/mL olarak gözlemlendi. Biyofilm inhibisyon oranları %42,34 (5mg/mL) ile %9,48 (0,62 mg/mL) arasında değişirken, belirgin etki MİK ve 1/2MİK konsantrasyonlarında izlendi. Eradikasyon oranları %6,15 (5 mg/mL) ile %41,15 (20 mg/mL) arasında seyretmiş, belirgin etki 4MİK konsantrasyonunda izlenmiştir. MRSA'ya kıyasla eradikasyon etkisinin daha düşük düzeyde kalması, MSSA biyofilmlerinin ekstrakta karşı daha dirençli olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, MSSA suşlarının biyofilm matriks yapısında ekstrakt penetrasyonunu sınırlayan farklılıklar olabileceğini ve bu suşların biyofilm formunda daha dirençli bir fenotip sergileyebileceğini göstermektedir.

Rhus coriaria L. ekstraktı ise *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 0,62 mg/mL ve 2,5 mg/mL olarak belirlendi. Bu suş, çalışmada en güçlü antibakteriyel etkinliğin gözlemlendiği bakterilerden biri olmuştur. Biyofilm inhibisyon oranı MİK düzeyinde %31,10 (0,62mg/mL) iken, 1/8 MİK seviyesinde %4,93'e (0,07mg/mL) kadar düşmüştür. Eradikasyon oranları ise oldukça sınırlı kalmış; 4MİK konsantrasyonunda dahi %5,61 (2,5mg/mL) eradikasyon sağlanabilmiştir. Bu durum, MRSA biyofilmlerinin ekstrakta karşı dirençli olduğunu göstermektedir. *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşunda ise MİK ve MBK değerleri 1,25 mg/mL ve 2,5 mg/mL olarak belirlendi. Biyofilm inhibisyon oranları orta düzeyde bulunmuş, %46,96 (1,25mg/mL) ile %42,59 (0,15mg/mL) arasında, bu da ekstraktın MSSA biyofilm oluşumunu baskılamada etkili olduğunu göstermektedir. Eradikasyon oranları MİK düzeyinde %6,73 (1,25mg/mL) iken, 4MİK konsantrasyonunda %24,31'e (5mg/mL) ulaşmıştır. MSSA biyofilmleri MRSA'ya kıyasla daha duyarlı görünmektedir.

Rendeková ve ark.(2015) çalışmasında *Cotinus coggygria* Scop. yaprak metanol ekstraktı, hem referans MRSA ve MSSA hem de klinik *S. aureus* suşlarına karşı antibakteriyel etki göstermiştir. MIC değerleri 0.156–0.313 mg/mL, bakterisidal konsantrasyonlar ise 0.313–0.625 mg/mL arasında bulunmuştur. Aynı çalışmada, biyofilm ortamında ekstraktın 8 mg/mL'de biyofilm oluşumunu inhibe ettiği, 32 mg/mL'de ise tamamen eradike ettiği bildirilmiştir(77). Benzer şekilde, Yu ve ark.(2008) tarafından yapılan çalışmada *C. coggygria*'nın aseton ve etil asetat ekstraktlarının *S. aureus*'a karşı MIC 25 µg/mL düzeyinde yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir (78). Her iki çalışma, ekstraktın *S. aureus* suşlarına karşı hem planktonik hem de biyofilm formunda etkili olduğunu ortaya koymakta ve mevcut bulgularımızı desteklemektedir.

Gezici ve ark. (2019), *Rhus coriaria* L. meyvesinden elde ettikleri farklı ekstraktlarla (su, metanol, n-heksan, diklorometan) gerçekleştirdikleri çalışmada, *S. aureus* suşuna karşı 500 µg/mL düzeyinde MİK bildirerek ekstraktların antibakteriyel

potansiyelini ortaya koymuşlardır (79). Başka bir çalışmada, Ceylan ve ark. (2019), *Rhus coriaria* L. bitkisinin yaprak ve meyvelerinden elde ettikleri metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkilerini *S. aureus*, referans suş üzerinde incelemişlerdir. Meyve ekstraktı için 500 µg/mL, yaprak ekstraktı için ise 1000 µg/mL düzeylerinde MİK değerleri ile antibakteriyel etkinlik gözlemlenmiştir (80). Her iki çalışma planktonik hücreler üzerinde gerçekleştirilmiş olmakla birlikte, bildirilen bulgular mevcut çalışmada gözlenen antibakteriyel etkinliği destekler niteliktedir.

Bu çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktı *Enterococcus faecalis* suşunda hem MİK hem MBK değeri 5 mg/mL olarak saptandı, bu da bakterisidal etkinin inhibitör dozda sağlanabildiğini göstermektedir. Biyofilm inhibisyon oranları %47,39 (5mg/mL) ile %12,94 (0,62mg/mL) arasında; eradikasyon oranları ise %50,20 (5mg/mL) ile %66,04 (20mg/mL) arasında belirlendi. Bu suşta hem inhibisyon hem eradikasyon açısından en yüksek etkinlik gözlemlenmiştir. *Rhus coriaria* L. ekstraktı, *C. coggygia* ile benzer şekilde, *Enterococcus faecalis* suşunda hem MİK hem de MBK açısından 5 mg/mL değerinde etki göstermiştir. Bu sonuç, *C. coggygia* ekstraktının da *E. faecalis* için bakterisidal olduğunu düşündürmektedir. Biyofilm inhibisyon oranları %14,78 (5mg/mL) ile %6,83 (0.62mg/mL) arasında düşük düzeyde kalmış, ancak eradikasyon oranları MİK ve üzeri konsantrasyonlarda %24,24 (5mg/mL) ile %38,93 (20mg/mL) arasında anlamlı şekilde artmıştır. Bu bulgular, ekstraktın biyofilm oluşumunu önlemeden ziyade, mevcut biyofilmleri parçalama kapasitesinin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktı *Staphylococcus epidermidis* suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olarak belirlendi. Biyofilm inhibisyon oranları %11,21(2,5mg/mL) ile %7,58 (0,31mg/mL) arasında düşük düzeyde kalırken, eradikasyon oranları %49,15 (2,5mg/mL) ile %53,08 (10mg/mL) arasında daha güçlü seviyede bulundu. Bu sonuçlar, ekstraktın biyofilm oluşumunu engellemede sınırlı, ancak mevcut biyofilmi parçalamada daha etkili olduğunu göstermektedir. *Rhus coriaria* L. ekstraktı ile yapılan çalışmada ise

Staphylococcus epidermidis suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 0,62 mg/mL ve 1,25 mg/mL olarak belirlendi. Biyofilm inhibisyonu MİK düzeyinde %31,46 (0,62 mg/mL) iken, 1/8 MİK konsantrasyonunda %0,00 (0,07 mg/mL) olarak saptandı. Eradikasyon oranları ise tüm konsantrasyonlarda %2,74'ü geçmedi. Bu sonuçlar, ekstraktın planktonik *S. epidermidis* hücrelerine karşı yüksek antibakteriyel etkinlik gösterdiğini; buna karşın, biyofilm inhibisyonu ve eradikasyonu açısından etkisinin zayıf kaldığını göstermektedir.

Marcetić ve ark. (2013), *Cotinus coggygria* Scop. yaprak ve dallarını içeren genç sürgünlerinden elde edilen asetone, kloroform, etil asetat ve su ekstraktı ile antimikrobiyal etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada, etil asetat ekstraktının *E. faecalis* ve *S. epidermidis* suşlarına sırasıyla 200 µg/mL ve 50 µg/mL MİK değerleriy etkili olduğunu bildirmiştir. (81). Benzer bir çalışmada, Tunç ve ark. (2013), *C. coggygria* yapraklarından elde edilen petrol eteri, kloroform, aseton, metanol, etanol ve distile su ekstraktlarının antibakteriyel etkilerini değerlendirmiştir. *E. faecalis* ve *S. epidermidis* suşları üzerinde yapılan testlerde, özellikle metanol ve distile su ekstraktlarının her iki bakteriye karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği; distile su ekstraktının *E. faecalis* üzerinde en güçlü etkiyi oluşturduğu rapor edilmiştir (82). Her iki çalışmada da *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktlarının çalışmamızla uyumlu şekilde *E. faecalis* ve *S. epidermidis* suşları üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdiği bildirilmiş. Dastjerdi ve ark.(2014) tarafından yürütülen çalışmada ise *Rhus coriaria* L. meyve kabuklarından elde edilen su ekstraktının antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri, yaygın oral patojenler olan *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* ve *E. faecalis* suşları üzerinde değerlendirilmiştir. Ekstraktın konsantrasyonuna bağlı olarak tüm suşlarda anlamlı düzeyde antibakteriyel ve antibiyofilm aktivite gözlemlenmiş; en yüksek duyarlılık *S. sobrinus* suşunda tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, *E. faecalis* suşu için MİK ve MBK değerleri sırasıyla 0,781 mg/mL ve 25 mg/mL olarak belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisi ise farklı ekstrakt konsantrasyonlarında *E. faecalis* suşu için sırasıyla %76,4 (MİK), %74,5 (1/2MİK), %54,9 (1/4 MİK) ve %40,6 (1/8MİK) olarak bildirilmiştir (83). Mevcut çalışmamızda ise *E. faecalis* suşu için MİK ve MBK değerleri eşit (5

mg/mL) olarak belirlenmiş ve bu nedenle ekstraktın bakterisidal etki gösterdiği değerlendirilmiştir. Ayrıca, biyofilm inhibisyon oranları Dastjerdi ve ark.'nın çalışmasına kıyasla daha düşük düzeyde saptanmıştır. Bu farklılık, ekstraktın hazırlanma yöntemi (su ekstraktı, etil asetat ekstraktı vs.), hedef suşun fenotipik özellikleri, test edilen konsantrasyon aralıkları ve uygulanan metodoloji gibi faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. Dolayısıyla, ekstrakt tipi ve deneysel koşulların antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlik üzerinde belirleyici olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktının *Escherichia coli* suşu üzerindeki antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiş; MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olarak saptanmıştır. Antibakteriyel etkinlik açısından duyarlılığın yüksek olduğu görülmektedir. Gram negatif bakterilerde hücre duvarının yapısı nedeniyle bitkisel ajanların etkinliği sınırlı olabilmektedir. Ancak düşük MİK değeri, ekstraktın *E. coli* üzerinde etkili bir inhibitör potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. *Rhus coriaria* L. ekstraktı için ise *E. coli* suşunda belirlenen MİK ve MBK değerleri sırasıyla 1,25 mg/mL ve 2,5 mg/mL'dir. MBK değerinin MİK'in iki katı olması, ekstraktın bakteriyel çoğalmayı baskılayarak öncelikle bakteristatik bir etki mekanizmasıyla çalıştığını göstermektedir.

Çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktı ile *Klebsiella pneumoniae* suşuna yönelik gerçekleştirilen antimikrobiyal etkinlik analizinde, MİK ve MBK değerleri sırasıyla 5 mg/mL ve 10 mg/mL olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar, ekstraktın bu fırsatçı patojen üzerinde orta düzeyde bir etkinlik sergilediğini ve fitokimyasal bileşenlerin Gram-negatif bakterilere karşı potansiyel kullanımını desteklediğini göstermektedir. *Rhus coriaria* L. ekstraktı ise *Klebsiella pneumoniae* suşunda hem MİK hem de MBK değerlerinin 2,5 mg/mL olarak belirlenmiş olması, ekstraktın yalnızca bakteriyel büyümeyi inhibe etmekle kalmayıp aynı zamanda bakterisidal etki de gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, ekstraktın içerdiği

aktif bileşenlerin hücre ölümüne yol açacak düzeyde etkili olduğunu ve bakteriyel direnç mekanizmalarını aşabildiğini düşündürmektedir.

Goncagül ve ark.(2020) tarafından yürütülen çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ile yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen klinik *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (84) . Başka bir çalışmada, Matic ve ark.(2011) tarafından *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin metanolik kök ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi, *S. aureus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* dahil olmak üzere toplam altı farklı mikroorganizma üzerinde değerlendirilmiştir. Ekstraktın en yüksek konsantrasyonu olan 500 µg/mL, tüm test bakterilerinde değişen çaplarda inhibisyon zonları oluşturmuştur. Özellikle *E. coli*, ekstreye karşı en duyarlı mikroorganizmalar arasında yer almıştır (85). Bu literatür verileri, çalışmamızla uyumlu şekilde ekstraktın *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiğini; ayrıca *E. coli*'nin ekstrakta karşı daha yüksek duyarlılık sergilediğini ortaya koymaktadır. Ceylan ve ark.(2019), *Rhus coriaria* L. bitkisinin yaprak ve meyvelerinden elde ettikleri metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkilerini *S. epidermidis* ve *E. coli* referans suşları üzerinde incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, meyve ekstraktı için 500 µg/mL, yaprak ekstraktı için ise 500–1000 µg/mL düzeylerinde MİK değerleri ile antibakteriyel etkinlik gözlemlenmiştir (80). Bu bulgular, mevcut çalışmamızda *E. coli* suşuna karşı gözlenen antibakteriyel etkinlikle genel eğilim açısından örtüşmekte olup, ekstraktın Gram-negatif bakterilere karşı inhibitör potansiyelini destekler niteliktedir. Yine Nasar-Abbas ve ark.(2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Rhus coriaria* L . meyvesinden elde edilen su ekstraktının antibakteriyel etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada Gram pozitif türler olarak *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes* ve *S. aureus*; Gram negatif türler olarak ise *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *E. coli* Tip I, *E. coli* O157:H7, *Proteus vulgaris* ve *Salmonella enteritidis* suşları kullanılmıştır. Su ekstraktı tüm türlere karşı farklı oranlarda antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Genel olarak, Gram negatif bakterilerin—*P. vulgaris* ve *C. freundii* hariç—Gram pozitif türlere kıyasla daha

dirençli olduğu bildirilmiştir (86). Bu çalışma, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı gözlenen antibakteriyel etkinlik açısından mevcut çalışmamızla örtüşmektedir.

Bu çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 5 mg/mL ve 10 mg/mL olarak tebit edildi. Ancak biyofilm inhibisyon oranları oldukça düşük düzeyde kalmış; %2,89 (5 mg/mL) ile %0,60 (0,62 mg/mL) arasında değişmiştir. Eradikasyon oranları ise yalnızca 4MİK konsantrasyonunda (%83,21; 20 mg/mL) anlamlı düzeye ulaştı. Bu bulgular, *P. aeruginosa* suşunun biyofilm formunda yüksek direnç gösterdiğini ve yalnızca yüksek dozlarda etkili eradikasyon sağlanabildiğini ortaya koymaktadır. *P. aeruginosa*'nın biyofilm yapısı, yoğun ekstraselüler polimerik madde (EPS) üretimi, quorum sensing mekanizmaları ve antibiyotik penetrasyonunu sınırlandıran fiziksel bariyerler nedeniyle oldukça dirençlidir. Bu nedenle, düşük ve orta düzey konsantrasyonlarda biyofilm inhibisyonunun sınırlı kalması beklenen bir durumdur. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, bu suşun biyofilm formuna karşı etkili bir eradikasyon için yüksek dozda ekstrakt uygulanması gerektiğini göstermektedir. *Rhus coriaria* L. ekstraktının ise *Pseudomonas aeruginosa* suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 1,25 mg/mL ve 2,5 mg/mL olarak belirlendi. Biyofilm inhibisyonu yalnızca MİK düzeyinde anlamlı bulundu (%27,74- 1,25 mg/mL), daha düşük konsantrasyonlarda etkisizlik gözlemlendi. Eradikasyon oranları tüm konsantrasyonlarda %0,38'in altında kaldı. Bu suş, biyofilm direnci açısından en düşük eradikasyon yanıtını vermiştir.

Polat ve ark. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. meyve ekstraktlarının *P. aeruginosa* üzerindeki antibiyofilm etkisinin kullanılan ekstraksiyon solventine bağlı olarak anlamlı düzeyde değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Asetonla elde edilen ekstraktlarda antibiyofilm aktivitesi saptanmazken, metanol ekstraktında %16,68 oranında biyofilm inhibisyonu gözlemlenmiştir (87). Bu bulgu, mevcut çalışmamızdaki sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Marcetić ve ark. (2013), *C. coggygria*'nın yaprak ve dallarından farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkilerini değerlendirmiş; etil asetat ekstraktının *P.*

aeruginosa'ya karşı 200 µg/mL MİK değeriyle anlamlı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir (81). Bu literatür bulguları, tarafımızca yürütülen çalışmayla da uyumlu olup, *C. coggygia* ekstraktlarının *P. aeruginosa* üzerinde çok güçlü olmayan bir antibakteriyel etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Akrayi ve ark. (2015), *R. coriaria*'nın su ekstraktı ile yaptıkları antibakteriyel çalışmada *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *P. mirabilis* suşlarını kullanmışlardır. *R. coriaria* su ekstraktı, test edilen bakterilere karşı inhibitör ajan rolü oynayan yüksek düzeyde aktivite göstermiştir. MIC değerleri *E. coli* için %4, *P. aeruginosa* için %2 ve hem *K. pneumoniae* hem de *P. mirabilis* için %0.025 olarak bildirilmiştir. Bu bulgular, *R. coriaria*'nın Gram-negatif bakterilere karşı etkili bir antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (88). Mevcut çalışmamızda ise *K. pneumoniae* (2,5mg/mL) suşunun *E. coli*'ye (1,25mg/mL) kıyasla daha dirençli bir profil sergilediği gözlemlenmiştir. Bu farklılık, kullanılan ekstraktın hazırlanma yöntemi, suşların klinik kökenleri, test koşulları veya bakteriyel direnç mekanizmalarındaki varyasyonlarla ilişkili olabilir. Dolayısıyla, *R. coriaria*'nın antimikrobiyal etkinliğinin suş spesifikliği ve ekstrakt bileşen profili açısından daha ayrıntılı analizlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının *A. baumannii* suşunda MİK ve MBK değerlerinin eşit (2,5 mg/mL) olduğu; benzer şekilde, *Rhus coriaria* L. ekstraktında da bu değerlerin eşit (1,25 mg/mL) saptandığı belirlenmiştir. Her iki ekstraktın kendi içindeki MİK ve MBK eşitliği, doğrudan bakterisidal etki gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Bu durum, ekstraktların içerdiği aktif bileşenlerin hücre membran bütünlüğünü bozarak veya temel metabolik süreçleri hedef alarak doğrudan bakterisidal etki oluşturduğunu düşündürmektedir.

Goncagül ve ark. (2020) tarafından yürütülen çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının antibakteriyel potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, 5–20 µL ekstrakt emdirilmiş disklerle yapılan uygulamalarda *A. baumannii* suşuna karşı değişen oranlarda inhibisyon zon çapları

bildirilmiştir. Söz konusu zon çapları, ekstraktın bu suş üzerinde ,çalışmamıza benzer şekilde, antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymakla birlikte, bakterisidal etkinlik hakkında doğrudan bir yorum içermemektedir (84) . Al-Hayanni ve ark. (2022), *Rhus coriaria* L. meyvelerinden elde edilen su ve alkol ekstraktların, çoklu antibiyotik direncine sahip klinik izolatlar üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada incelenen bakteriyel suşlar arasında *S. aureus*, *E. faecalis*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* yer almakta olup, bu izolatlar çeşitli klinik örneklerden elde edilmiştir. Bulgular, her iki ekstrakt türünün de tüm test suşlarına karşı anlamlı düzeyde antibakteriyel ve antibiyofilm aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle alkol ekstraktın, sulu ekstrakta kıyasla daha yüksek inhibisyon kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu veriler, *Rhus coriaria* L. meyve ekstraktlarının, antibiyotiklere dirençli patojenlerin kontrolünde doğal ve etkili bir alternatif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (89). Mevcut çalışmamızda, antibakteriyel etkinlik gözlemlenmiş olmakla birlikte, *P. aeruginosa* suşuna yönelik biyofilm inhibisyon yüzdesi oldukça düşük bulunmuş; eradikasyon etkisi ise saptanmamıştır. Bu durum, ekstraktın biyofilm matriksine penetrasyon kapasitesi, suşun fenotipik özellikleri veya ekstraktın bileşen profiline bağlı farklılıklarla açıklanabilir.

Bu çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının *Enterobacter cloacae* suşuna yönelik yapılan antimikrobiyal değerlendirmede, ekstraktın MİK ve MBK değerleri sırasıyla 5 mg/mL ve 10 mg/mL olarak saptandı. Bu bulgu, ekstraktın söz konusu suş üzerinde bakteriyostatik etkiyle başlayan ve bakterisidal düzeye ulaşan bir aktivite profili sergilediğini düşündürmektedir. Elde edilen veriler, *C. coggygia* kaynaklı fitokimyasal bileşenlerin fırsatçı patojenler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre sunmaktadır. *Rhus coriaria* L. ekstrakta ise *Enterobacter cloacae* suşu için belirlenen MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olup, bu sonuçlar söz konusu suşun test edilen diğer bakteriler arasında *Serratia marcescens* ile birlikte en yüksek direnç düzeyine sahip olduğunu göstermektedir.

Stojković ve ark. (2025) tarafından yürütülen çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. kabuk, yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının *Enterobacter cloacae* suşuna karşı 0,25–8 mg/mL aralığında MİK ve 4– >8 mg/mL aralığında MBK değerleriyle antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (90). Bu literatür bulguları, çalışmamızı desteklemektedir. Lauk ve arkadaşları (1998), *Rhus coriaria* L. bitkisinin yapraklarından elde edilen metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında, *E. cloacae* için MİK değerini 0,312 mg/mL, MBK değerini ise 0,625 mg/mL olarak bildirmişlerdir. Bu bulgular, bitkinin yaprak ekstraktlarının bakteriyel büyümeyi baskılayıcı ve öldürücü potansiyelini ortaya koymakta olup, özellikle fenolik bileşiklerin yoğunluğu ile ilişkilendirilmektedir (91). Mevcut çalışmamızda, *E. cloacae* *Rhus coriaria* L. ekstraktına en yüksek direnç gösteren bakterilerden biri olarak belirlenmiştir. Bu durum, ekstraktın etkinliğinin tür bazında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının *Serratia marcescens* suşunda MİK değeri 2,5 mg/mL, MBK değeri ise 10 mg/mL olarak belirlendi. Biyofilm inhibisyon oranları %14,64 (2,5mg/mL) ile %2,27 (0,31mg/mL) arasında; eradikasyon oranları ise %37,78 (2,5mg/mL) ile %50,97 (10mg/mL) arasında izlendi. Etkinliğin uygulanan konsantrasyonla birlikte artış göstermesi, ekstraktın doz bağımlı bir antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle eradikasyon oranlarının inhibisyona kıyasla daha yüksek olması, ekstraktın mevcut biyofilm yapıları üzerinde daha belirgin bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. *Rhus coriaria* L. ekstraktının ise *Serratia marcescens* suşunda MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olarak belirlendi. Bu bulgular, çalışmada *Rhus coriaria* L. ekstraktına en düşük duyarlılık gösteren suşlardan biri olduğunu ortaya koymaktadır. Biyofilm inhibisyon oranları %35,34 (2,5mg/mL) ile %1,74 (0,31mg/mL) arasında değişirken, eradikasyon oranları %2,46 (2,5mg/mL), %5,45 (5mg/mL) ve %32,34(10mg/mL) oranlarında gözlemlendi. Biyofilm inhibisyonu düşük konsantrasyonlarda sınırlı kalırken, eradikasyon yalnızca yüksek dozlarda anlamlı düzeye ulaşabilmiş; bu durum ekstraktın hem biyofilm oluşumunu baskılamada hem

de mevcut biyofilmi ortadan kaldırmada sınırlı etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Zazharskyi ve ark. (2020) tarafından *C. coggygia*'nın yaprak ve sürgünlerinden elde edilen etanol ekstraktı ile yürütülen çalışmada, *S. marcescens* suşunun 13,7 mm'lik inhibisyon zon çapı ile antibakteriyel etkinlik gösterdiğini bildirilmiştir (92). Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, uygun konsantrasyonda *Cotinus coggygia* Scop. kaynaklı ekstraktın *S. marcescens* gibi nozokomiyal enfeksiyon etkenlerine karşı hem planktonik hem de biyofilm formundaki hücreler üzerinde etkili olabileceği anlaşılmaktadır. Bu durum, bitkinin antibiyofilm potansiyelinin özellikle dirençli Gram-negatif patojenlerle mücadelede alternatif bir biyolojik ajan olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Bonjar ve ark. (2004), *Rhus coriaria* L. meyvesinden elde edilen metanol ekstraktının 15 mg/mL konsantrasyonunda *S. marcescens* üzerinde antibakteriyel etki göstermediğini bildirmiştir. Bu durum, söz konusu türün fitokimyasal ajanlara karşı doğal direnç mekanizmalarıyla açıklanmıştır (93). Ancak mevcut çalışmada, aynı bitkiden elde edilen ekstraktla yapılan mikrodilüsyon testlerinde, en dirençli bakterilerden biri olmakla birlikte, *S. marcescens* için MİK değeri 2,5 mg/mL, MBK değeri ise 5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, kullanılan ekstraktın bileşen profili, ekstraksiyon yöntemi ve test koşullarındaki farklılıkların antibakteriyel etkinliği anlamlı düzeyde etkileyebileceğini göstermektedir.

Bu çalışma, çağımızın en ciddi sağlık sorunlarından biri olan antibiyotik direncine karşı bitkisel kaynakların potansiyel bir alternatif oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, ekstraktların fenolik bileşikler, flavonoidler, tanenler ve diğer sekonder metabolitler açısından kimyasal profillerinin ayrıntılı şekilde karakterize edilmesi; bu bileşenlerin mikroorganizmalara karşı etkilerinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması; ayrıca solventler ve farklı bileşikler arasındaki sinerjik, aditif veya antagonistik etkileşimlerin ortaya konması, hem bilimsel ilerleme hem de terapötik uygulamalar açısından kritik öneme sahiptir. Elde edilen bulgular,

Cotinus coggygia Scop. ve Rhus coriaria L. bitkilerinden elde edilen etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal tedavide değerdendirilebilecek potansiyel ajanlar arasında yer aldığını göstermekte; böylece mevcut bilgi birikimine katkı sağlamanın yanı sıra gelecekteki araştırmalara da yön verici nitelikte bir temel oluşturmaktadır



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. ve *Rhus coriaria* L. bitkilerinin etil asetat ekstraktlarının, çeşitli klinik öneme sahip mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri değerlendirildi. *S.aureus* (MRSA ve MSSA), *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* ve *S.marcescens* gibi patojenlerin standart ATCC suşları üzerinde gerçekleştirilen analizlerde, sıvı mikrodilüsyon ve mikrotitrasyon plak yöntemleri kullanıldı.

Antibakteriyel etkinlik; minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, mg/mL) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK, mg/mL) değerleri esas alınarak değerlendirildi. Antibiyofilm etkinlik ise MİK, 1/2MİK, 1/4MİK ve 1/8MİK konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon yüzdesi (%); MİK, 2MİK ve 4MİK konsantrasyonlarında eradikasyon yüzdesi (%) ile belirlendi

C. coggygia ile yapılan çalışmalarda; en düşük MİK değeri (2,5 mg/mL) *S. epidermidis*, *E. coli*, *A. baumannii* ve *S. marcescens* suşlarında gözlemlenmiş; bu türlerin ekstrakta karşı daha yüksek duyarlılık sergilediği anlaşılmıştır. MBK düzeyinde ise yalnızca *A. baumannii* suşu 2,5 mg/mL ile en düşük değeri göstermiş; *S. epidermidis*, *E. coli* ve *E. faecalis* suşlarında MBK değeri 5 mg/mL, diğerlerinde ise 10 mg/mL olarak belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdeleri MRSA, MSSA ve *E. faecalis* suşlarında daha yüksek; *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* ve *S. marcescens* suşlarında ise düşük bulunmuştur. Eradikasyon yüzdeleri MRSA, *E. faecalis*, *S. epidermidis* ve *S. marcescens* suşlarında yüksek iken; MSSA ve *P. aeruginosa* suşlarında daha düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Bu veriler, ekstraktın hem Gram pozitif hem de Gram negatif türlere karşı seçici ve değişken bir etki profili sergilediğini göstermektedir. *E. faecalis* ve *A. baumannii* suşlarında hem MİK hem MBK değerlerinin eşit olması, ekstraktın bakterisidal etkinliğini destekler niteliktedir. Ayrıca, bazı suşlarda eradikasyon

yüzdelерinin inhibisyona kıyasla daha yüksek olması, ekstraktın biyofilm yapılarına karşı eradikatif potansiyel taşıdığını düşündürmektedir.

Rhus coriaria L. ile yapılan çalışmalarda; en düşük MİK değeri (0,62 mg/mL), MRSA ve *S. epidermidis* suşlarında gözlemlenmiş; bu durum, söz konusu türlerin ekstrakta karşı daha yüksek duyarlılık sergilediğini göstermektedir. En yüksek MİK değeri ise *E. faecalis* suşunda 5 mg/mL olarak izlenmiş; diğer suşlarda MİK değeri 1,25–2,5 mg/mL aralığında belirlenmiştir. MBK değerlendirmesinde, *S. epidermidis* ve *A. baumannii* suşları 1,25 mg/mL ile en düşük değeri göstermiştir. Buna karşılık *E. faecalis*, *S. marcescens* ve *E. cloacae* suşlarında MBK değeri 5 mg/mL ile en yüksek düzeyde izlenmiş; diğer suşlarda ise MBK değeri 2,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Biyofilm inhibisyon yüzdeleri MSSA suşunda orta düzeyde bulunurken, diğer suşlarda düşük seviyede gerçekleşmiştir. Eradikasyon yüzdeleri ise tüm çalışma suşlarında düşük düzeyde kalmıştır.

C. coggygia Scop. ve *Rhus coriaria* L. etil asetat ekstraktları ile yapılan çalışmalarda elde edilen MİK ve MBK değeri ile inhibisyon ve eradikasyon yüzdeleri, tür bazlı antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerini ortaya koymuştur. Bitkisel ajanların antibakteriyel etkinliği; ekstraksiyon yöntemi, kullanılan solvent tipi, elde edilen ekstraktın bileşen profili ve test edilen bakteriyel suşların fenotipik ve genotipik özellikleri gibi çok sayıda faktörden etkilenmektedir. Ayrıca, bitkisel ekstraktların kimyasal içerikleri çevresel koşullara, hasat zamanına ve bitkinin yetiştiği coğrafi bölgeye bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu durum, literatürde bildirilen MİK değerlerindeki farklılıkları da açıklayabilmektedir. Dolayısıyla, bitkisel kaynaklı antimikrobiyal ajanların standardizasyonu, bileşen analizleri ile desteklenmeli ve farklı fenotipik direnç mekanizmalarına sahip klinik izolatlar üzerinde test edilerek etkinlikleri kapsamlı biçimde değerlendirilmelidir. Bu yönüyle bitkisel ekstraktlar, antibiyotiklere dirençli patojenlerin kontrolünde umut vadeden doğal alternatifler arasında yer almakta ve gelecekteki tedavi stratejilerine önemli katkılar sunabilecek potansiyele sahiptir.

KAYNAKLAR

1. Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. Archives of medical research, 36(6), 697-705.
2. Alam, M. M., Yasmin, M., Nessa, J., & Ahsan, C. R. (2010). Antibacterial activity of chloroform and ethanol extracts of black cumin seeds (*Nigella sativa*) against multi-drug resistant human pathogens under laboratory conditions. Journal of Medicinal Plants Research, 4(18), 1901-1905
3. Thabit, A. K., Crandon, J. L., & Nicolau, D. P. (2015). Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. Expert opinion on pharmacotherapy, 16(2), 159-177.
4. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention.
5. O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
6. Lyu, Y., Yu, M., Liu, Q., Zhang, Q., Liu, Z., Tian, Y., ... & Changdao, M. (2020). Synthesis of silver nanoparticles using oxidized amylose and combination with curcumin for enhanced antibacterial activity. Carbohydrate polymers, 230, 115573.
7. Nostro, A., Cellini, L., Ginestra, G., D'Arrigo, M., di Giulio, M., Marino, A., ... & Bisignano, G. (2014). Staphylococcal biofilm formation as affected by type acidulant. Apmis, 122(7), 648-653.
8. Subramanian, P., Shanmugam, N., Sivaraman, U., Kumar, S., & Selvaraj, S. (2012). Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. The Australasian medical journal, 5(7), 344.
9. Savage, V. J., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). Staphylococcus aureus biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 57(4), 1968-1970.

10. ECDC, E. (2009). Technical report: the bacterial challenge: time to react, a call to narrow the gap between multi-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents.
11. Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
12. Vanderbank, H. (1949). Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. Pharmazie, 4, 198-207.
13. Ahmed, M. M. (2010). Biochemical studies on nephroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) growing in Egypt. Nature and Science, 8(3), 41-47.
14. Borchardt, J. R., Wyse, D. L., Sheaffer, C. C., Kauppi, K. L., Fulcher, R. G., Ehlke, N. J., ... & Bey, R. F. (2008). Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. Journal of medicinal plants research, 2(5), 98-110.
15. Stanić, S., Matic, S., Solujić, S., & MILOŠEVIĆ, T. A. N. J. A. (2009). Genotoxicity testing of the methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* and gallic acid on *Drosophila melanogaster*. Archives of Biological Sciences, 61(2), 261-266
16. Abu-Reidah, I. M., Jamous, R. M., & Ali-Shtayeh, M. S. (2014). Phytochemistry, pharmacological properties and industrial applications of *Rhus coriaria* L.(sumac). Jordan journal of biological sciences, 7(4).
17. Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. Molecules, 25(6), 1340.
18. URL1; <https://slideplayer.com/slide/4653118/15/images/13/Bacterial+Cell+Wall+Gram-Positive+%26+Gram-Negative.jpg>
19. Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Jones & Bartlett Learning.
20. Kumar, S. (2015). Essentials of microbiology. JP Medical Ltd
21. Murray, P. R., Rosenthal, K., & Pfaller, M. A. (2017). Microbiología médica. Elsevier Health Sciences.

22. Haeggman, S., Lofdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., & Brisse, S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), 2400-2408.
23. Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9(9), 1071-1081.
24. Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 9(4), 228-236.
25. Ashurst, J. V., & Dawson, A. (2018). *Klebsiella pneumoniae*.
26. Annavajhala, M. K., Gomez-Simmonds, A., & Uhlemann, A. C. (2019). Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in microbiology*, 10, 44.
27. Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887-902.
28. Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M., & Haas, D. (1991). Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 5(6), 1483-1490.
29. Mahlen SD (2011). *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews* 24(4): 755-791.
30. Jubeh, B., Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, 25(12), 2888
31. Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), 10-1128.
32. Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 178.

33. Arabacı, Ç., & Uzun, B. (2021). Staphylococcus aureus İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi. *Klimik Journal/Klimik Dergisi*, 34(1).
34. Yıldırım, M. (2007). Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Duzce Medical Journal*, 9(2), 46-52
35. Gomes, F., Teixeira, P., & Oliveira, R. (2014). Mini-review: Staphylococcus epidermidis as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling*, 30(2), 131-141
36. Flemming, H. C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247-260.
37. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633
38. Qvortrup, K., Hultqvist, L. D., Nilsson, M., Jakobsen, T. H., Jansen, C. U., Uhd, J., ... & Tolker-Nielsen, T. (2019). Small molecule anti-biofilm agents developed on the basis of mechanistic understanding of biofilm formation. *Frontiers in chemistry*, 7, 742.
39. Temel, A., & Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(1), 1-13.
40. 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
41. Ch'ng, J. H., Chong, K. K., Lam, L. N., Wong, J. J., & Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 82-94.
42. Gunn, J. S., Bakaletz, L. O., & Wozniak, D. J. (2016). What's on the outside matters: the role of the extracellular polymeric substance of Gram-negative biofilms in evading host immunity and as a target for therapeutic intervention. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12538-12546.
43. Jones, E. A., McGillivray, G., & Bakaletz, L. O. (2013). Extracellular DNA within a nontypeable Haemophilus influenzae-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *Journal of innate immunity*, 5(1), 24-38

44. Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., & Khan, J. (2020). Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11, 566325
45. Spormann, A. M. (2008). Physiology of microbes in biofilms. *Bacterial Biofilms*, 17-36.
46. Van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International journal of food microbiology*, 144(3), 421-431.
47. Seneviratne, C. J., Suriyanarayanan, T., Swarup, S., Chia, K. H. B., Nagarajan, N., & Zhang, C. (2017). Transcriptomics analysis reveals putative genes involved in biofilm formation and biofilm-associated drug resistance of *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, 43(6), 949-955.
48. Esertaş, ÜZÜ. (2020). Rize ve çevresinde yetişen bazı bitkilerden elde edilen özütlerin anti-mikrobiyal aktivite ve quorum sensing mekanizmalarına etkilerinin belirlenmesi(Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
49. Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 52-67
50. Durukan, İ. (2013). *Nigella sativa* L. tohumlarının çoğul dirençli klinik izolatlar üzerinde antimikrobiyal etkisinin araştırılması (Yüksek lisans tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
51. Hizlisoy, H. (2009). Çeşitli mikroorganizmalar üzerine gilaburunun antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi
52. Tanker, N., Koyuncu, M., & Coskun, M. (2007). *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, Ankara Üniv. Ecz. Fak. Yayınları, 324
53. Abay, E. (2006). Bazı bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkilerinin disk difüzyon yöntemiyle araştırılması (Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
54. Dağcı, E. K., & Dığrak, M. (2005). Bazı meyve ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(2), 1-7

55. Güdücü, F. (2014). *Pyrus elaeagrifolia* bitkisi ekstrelerinin fenolik madde içerikleri, DPPH radikali giderme aktiviteleri ve in vitro antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi.
56. Baydar, H. (2009). Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi. Nobel Akademik Yayıncılık.
57. Altuner, E. M. (2008). Bazı karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (Doctoral dissertation, Ankara Universitesi (Turkey))
58. Çiftçi, B., Karaman, K., & Kaplan, M. (2020). Farklı Solvent Tipi ile Yapılan Ekstraksiyon İşleminin Hünnap (*Ziziphus jujube*) Meyvesinin Biyoaktif zellikleri zerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1), 256-268.
59. Arslan, D., Aydın, M., & Türker, S. (2021). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Ekstraksiyon Yöntemleri, Gıdalarda Kullanımı ve Takviye Edici Gıda Alanında Değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(5), 926-936
60. Matić, S., Stanić, S., Mihailović, M., & Bogojević, D. (2016). *Cotinus coggygia* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 452-461
61. ATEş, D. A., & TURGAY, . (2003). Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 27(3), 157-162.
62. Dadgar, T., Asmar, M., Saifi, A., Mazandarani, M., Bayat, H., Moradi, A., ... & Ghaemi, E. (2006). Antibacterial activity of certain Iranian medicinal plants against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*.
63. Gner, A., & Aslan, S. (Eds.). (2012). *Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler)*. Nezahat Gkyiğit Botanik Bahesi Yayınları
64. <http://www.agacler.net/forum/calilar/711.htm>
65. URL3, <http://www.wildchicken.com/cotinus>
66. Karadaş, ., Yılmaz, İ., & Gegel, . (2020). Properties of sumac plant and its importance in nutrition. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 4(3), 377-383.

67. Batiha, G. E. S., Ogunyemi, O. M., Shaheen, H. M., Kutu, F. R., Olaiya, C. O., Sabatier, J. M., & De Waard, M. (2022). *Rhus coriaria* L.(Sumac), a versatile and resourceful food spice with cornucopia of polyphenols. *Molecules*, 27(16), 5179.
68. Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (1998). Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 973-980.
69. Söyletir, G. (2013). EUCAST ve CLSI Tercihleri: Türkiye’de Nereye Gitmeliyiz. *Ankem Dergisi*, 27, 19-20.
70. <https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>
71. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement M100-S24, Vol. 34 No. 1, 950 West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA, 2014
72. URL-4, <https://emerypharma.com/wp-content/uploads/2022/11/MIC-pic.jpg>
73. Gür, D. (2016). Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: uygulama, yorum ve uzman kurallar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 46, 12-19.
74. Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., & Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità*, 25(1), 31-42.
75. Kumar, V. P., Chauhan, N. S., Padh, H., & Rajani, M. (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 107(2), 182-188
76. Kone, W. M., K. K. Atindehou, C. Terreaux, K. Hostettmann, D. Traore, and M. Dosso. 2004. Traditional medicine in North Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 43-49.
77. Rendeková, K., Fialová, S., Jánošová, L., Mučaji, P., & Slobodníková, L. (2015). The activity of *Cotinus coggygria* scop. Leaves extract on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic and biofilm growth forms. *Molecules*, 21(1), 50.

78. Yu, L., Xiang, H., Fan, J., Wang, D., Yang, F., Guo, N., ... & Deng, X. (2008). Global transcriptional response of *Staphylococcus aureus* to rhein, a natural plant product. *Journal of biotechnology*, 135(3), 304-308.
79. Gezici, S. (2019). Neuroprotective effect, antimicrobial and antioxidant potentials of sumac (*Rhus coriaria* L.) fruit extracts. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 47(2), 165-170
80. Ceylan, Ş., Yazar, R., Camadan, Y., Saral, Ö., & Özşen, Ö. (2019). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants grown in Şırnak region of Turkey. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 12(2), 628-638.
81. Marcetić M., Bozić D., Milenković, M., Malesević, N., Radulović, S., & Kovacević N. (2013). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygria* Scop. *Phytotherapy Research*, 27(11), 1658–1663.
82. Tunç, K., Hos, A., & Gunes, B. (2013). Investigation of antibacterial properties of *Cotinus coggygria* from Turkey. *Pol. J. Environ. Stud*, 22(5), 1559-1561.
83. Vahid-Dastjerdi, E., Sarmast, Z., Abdolazimi, Z., Mahboubi, A., Amdjadi, P., & Kamalinejad, M. (2014). Effect of *Rhus coriaria* L. water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Iranian journal of microbiology*, 6(4), 269.
84. Goncagül, G., Güceyü, Ç. and Günaydın, E., 2020, Investigation of in-vitro antibacterial activity of *Cotinus coggygria* Scop. extracts. *Van Veterinary Journal*, 31(3):127-132 pp
85. Matić, S., Stanić, S., SOLUJIC, S., Milošević, T., & Niciforović, N. (2011). Biological properties of the *Cotinus coggygria* methanol extract. *Periodicum biologorum*, 113(1), 87-92
86. Nasar-Abbas, S. M., & Halkman, A. K. (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *International journal of food microbiology*, 97(1), 63-69.
87. Çiçek Polat, D., Gümüşok, S., Rızvanoğlu, S. S., & Eryilmaz, M. (2023). Bioactivities of *Cotinus coggygria* and its HPLC-DAD phenolic profiles. *Plant*

Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 157(5), 1061-1066

88. Akrayi, H. F., Salih, R. M., & Hamad, P. A. (2015). In vitro screening of antibacterial properties of *Rhus coriaria* and *Origanum vulgare* against some pathogenic bacteria. *ARO-the scientific journal of Koya University*, 3(2), 35-41.
89. Al-Hayanni, H. S. (2022). The antibacterial and anti-biofilm effects of Sumac (*Rhus coriaria* L) fruits extracts against some multidrug-resistant pathogenic bacteria. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*, 64(3), 183-188
90. Stojković, D., Dragičević, N., Ivanov, M., Gajović, N., Jurišević, M., Jovanović, I., ... & Živković, J. (2025). New Evidence for *Cotinus coggygria* Scop. Extracts Application in Gastrointestinal Ailments. *Pharmaceuticals*, 18(1), 98
91. Iauk, L., Caccamo, F., Speciale, A. M., Tempera, G., Ragusa, S., & Pante, G. (1998). Antimicrobial activity of *Rhus coriaria* L. leaf extract. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(S1), S152-S153.
92. Zazharskyi, V. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., Borovik, I. V., & Brygadyrenko, V. V. (2020). Antibacterial and fungicidal activities of ethanol extracts from *Cotinus coggygria*, *Rhus typhina*, *R. trilobata*, *Toxicodendron orientale*, *Hedera helix*, *Aralia elata*, *Leptopus chinensis* and *Mahonia aquifolium*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(2).
93. Bonjar, G. S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*