



**OLUŞAN MİKROBİYAL BİYOFİLMİN DEGRADASYONUNDA
SYZYGIUM AROMATICUM VE *SALVIA OFFICINALIS*
BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN ESANSİYEL YAĞLARIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
Dilara ÇİFTÇİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

Prof. Dr. İsa KARAMAN

**2020
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OLUŞAN MİKROBİYAL BİYOFİLMİN DEGRADASYONUNDA
SYZYGIUM AROMATICUM VE *SALVIA OFFICINALIS*
BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN ESANSİYEL YAĞLARIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilara ÇİFTÇİ

TOKAT
Haziran - 2020

Her hakkı saklıdır

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Dilara ÇİFTÇİ

26 Haziran 2020



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OLUŞAN MİKROBİYAL BİYOFİLMİN DEGRADASYONUNDA *SYZYGIUM AROMATICUM* VE *SALVIA OFFICINALIS* BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN ESANSİYEL YAĞLARIN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilara ÇİFTÇİ

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. İsa KARAMAN

Biyofilm, hücrelerin birbiri üzerine veya bulundukları yüzeye yapışarak yapısal bir bütünlük oluşturduğu karmaşık bir mikroorganizma kümesidir. Yürütülen bu çalışmada Clavenger cihazı ile karanfil ve adaçayından esansiyel yağlar elde edilmiştir. Elde edilen yağlar, oluşturulan mikrobiyal biyofilme etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Öncelikle 14 farklı mikroorganizmanın biyofilm oluşturma yeteneklerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en iyi biyofilm yapan mikroorganizmalar belirlenmiştir. En iyi biyofilm yapan bakteriler; *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* olarak saptanmıştır. Belirlenen bakterilere, 3 farklı materyal (Krom-metal, Cam, PVC) üzerinde biyofilm oluşturmaları için uygun şartlar sağlanmıştır. Oluşturulan mikrobiyal biyofilmler, belirlenen 4 farklı konsantrasyonda Dimetil Sülfoksit (DMSO), su ve esansiyel yağdan oluşan karışım içine alınmıştır. Esansiyel yağların, oluşturulan biyofilm üzerine etkisine bakılmıştır. Spektrofotometrede elde edilen sonuçlara göre kullanılan esansiyel yağların oluşturulan mikrobiyal biyofilm degradasyonunda etkisi olduğu saptanmıştır. Yürütülen çalışma da kullanılan bakteriler üzerindeki biyolojik aktiviteler Disk Difüzyon Metodu, MIC değerlerinin belirlenmesi metotlarına göre ortaya koyulmuştur.

2020, 58 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Biyofilm, Esansiyel Yağ, Degradasyon, Biyolojik Aktivite

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF ESSENTIAL OIL' S FROM *SYZYGium AROMATICUM* AND *SALVIA OFFICINALIS* IN THE DEGRADATION OF MICROBIAL BIOFILM

Dilara ÇİFTÇİ

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. Dr. İsa KARAMAN

Biofilm is a complex cluster of microorganisms in which cells adhere to each other or to the surface on which they form a structural integrity. In this study, essential oils were obtained from cloves and sage with the Clavenger device. The obtained oils are aimed to investigate the microbial biofilm effect created. Priority was examined of the ability of 14 different microorganisms to form biofilms. According to the results obtained, the best biofilm producing microorganisms were determined. The best biofilm-forming bacteria; *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. Appropriate conditions were provided for the identified bacteria to form biofilms on 3 different materials (Chrome-metal, Glass, PVC). The microbial biofilms formed were taken in a mixture of 4 different concentrations of Dimethyl Sulfoxide (DMSO), water and essential oil. According to the results obtained in the spectrophotometer, essential oils were found to have an effect on the microbial biofilm degradation. The biological activities on the bacteria used in the current study were determined according to the Disc Diffusion Method, the methods of determining the MIC values.

2020, 58 PAGE

KEYWORDS: Biofilm, Essential Oil, Degredation, Biological Activity

ÖNSÖZ

Yürüttüğüm çalışma boyunca emeğini hiç bir zaman esirgemeyen her türlü desteği sağlayan, tüm laboratuvar denemelerimde desteğini her zaman hissettiğim sayın danışman hocam Prof.Dr. İsa KARAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her konuda fikir ve görüşlerini aldığım Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde bulunan tüm hocalarıma sonsuz teşekkür ederim. Her zaman her konuda yanımda olan varlığını ve desteğini her zaman hissettiğim Ecem NAZIOĞLU ve ONUR KAÇAN'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca her kararında beni destekleyen her zaman yanımda olan babam Hüseyin ÇİFTÇİ ve annem Nesrin ÇİFTÇİ'ye kalpten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv-vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii-ix
ŞEKİL DİZİNİ	x
ÇİZELGE DİZİNİ	xi
TABLO DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Genel Özellikleri	6
2.1.1 <i>Syzygium Aromaticum</i> (Karanfil).....	6
2.1.2 <i>Salvia Officinalis</i> (Adaçayı)	9
2.2 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	12
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.3 Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Antibiyotikler	15
2.3.1 <i>Gentamisin</i>	15
2.3.2 <i>Eritromisin</i>	15
2.3.3 <i>Tetrasiklin</i>	15

3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1 Materyal.....	16
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitkiler.....	16
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	16
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Mikrobiyal Biyofilm Oluşturulan Yüzey Aparatları	16
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Mikrobiyal Biyofilm Oluşturma İçin Tasarlanan Düzenek	17
3.1.5 Çalışmada Kullanılan Solvent ve Genel Besiyerleri	17
3.2. Metod	18
3.2.1 Esansiyel Yağların Elde Edilmesi	18
3.2.2 Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanması	19
3.2.3 Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanması	19
3.2.4. Biyofilm Degredasyon Çözeltisinin Hazırlanması	20
3.2.5 Örneklerin Hazırlanması	21
3.2.6 Disk Difüzyon Metodu	21
3.2.7 Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)	22
4. BULGULAR	23
4.1 Biyofilm Degradasyon Spektrofotometre Ölçüm Sonuçları	23
4.1.1HPB42 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları	23
4.1.2 HPB42 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları	23

4.1.3 HPB42 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları.....	24
4.1.4 HPB42 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları	24
4.1.5 HPB42 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları	25
4.1.6 HPB42 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları	25
4.1.7 HPB36 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları	25
4.1.8 HPB36 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları	26
4.1.9 HPB36 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları	26
4.1.10 HPB36 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları	27
4.1.11 HPB36 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları	27
4.1.12 HPB36 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları	28
4.1.13 Malzemeler Üzerinde Oluşturulan Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda Esansiyel Yağ Kullanılmadan Alınan Sonuçlar	28

4.2 Disk Diifüzyonu Zon Ölçümleri	29
4.3 Mic Değerleri Elde Edilen Sonuçları	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	36
7.ÖZGEÇMİŞ	42



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrade Derece
g	Gram
L	Litre
µL	Mikro litre
m	Metre
mm	Milimetre
ml	Mililitre
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
nm	Nanometre
EO3	Adaçayından elde edilen esansiyel yağ
EO4	Karanfilden elde edilen esansiyel yağ
HPB-36	P. aureginosa'a ait suş kodu
HPB-42	Enterococcus faecalis'e ait suş kodu

Kısaltmalar	Açıklama
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
g (-)	Gram negatif
g (+)	Gram pozitif
EO	Esansiyel yağ
PVC	Polivinil Klorür
NB	Nutrient Broth
NA	Nutrient Agar
DMSO	Dimetil Sülfoksit
pH	Power of Hydrogen (Hidrojen gücü)
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
G	Gentamisin
TE	Tetracycline
E	Eritromisin
PK	Pozitif kontrol
NK	Negatif kontrol

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Syzygium Aromaticum</i> (Karanfil) bitkisinin genel görünüşü.....	6
Şekil 2.2 Kurutulmuş karanfil bitkisinin genel görünüşü	6
Şekil 2.3 Öjenol ve öjenol asetat molekül yapısı	8
Şekil 2.4 <i>Salvia Officinalis</i> (Adaçayı) bitkisinin genel görünüşü	9
Şekil 2.5 Kan kültüründe <i>E. faecalis</i>	14
Şekil 3.1 Adaçayının kurutma ve öğütme aşamaları	18
Şekil 4.1 HPB 42 bakterisi disk difüzyonu metodu zon oluşumu.....	28
Şekil 4.2 HPB42- HPB36 disk difüzyonu zon ölçümleri.....	29

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2.1 Karanfilin (100 g) besin meddeleri bileşimi.....8

Çizelge 2.2 *Salvia officinalis Linnaeus*'de bulunan aktif maddeler11



TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 Çalışma Kullanılan Mikroorganizmaların Suş Kod ve Adları.....	16
Tablo 4.1 Disk difüzyonu zon sıralamaları	28
Tablo 4.2 HPB -42'nin elde edilen disk difüzyon sonuçları	29
Tablo 4.3 HPB -36'nin elde edilen disk difüzyon sonuçları	30
Tablo 4.4 MIC değeri elde edilen sonuçlar	31

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar bir müddet öncesine kadar, çok hızlı üreyebilen ve yalnız başlarına hareket ederek serbest bir biçimde hareket eden canlılar olarak bilinmekteydi. Araştırmacılar bu bakımdan şu ana kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve öteki bakterilerden bağımsız olarak, yalnız başlarına dolaşan hücrelerin davranışlarını incelemiş ve çalışmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bunun yanı sıra, bakterilerin planktonik şeklinden çok, bir yüzeye veya birbirlerine tutunarak biyofilm olarak adlandırılan bir yapı oluşturarak yaşamlarını sürdürdüğüne dair kanıtların öne sürüldüğü birçok çalışmaya rastlanmıştır. Biyofilm, mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlikten meydana gelmektedir. (Elder ve ark. 1995).

Mikrobiyolojinin tarihine bakıldığı zaman büyük bir bölümünde, mikroorganizmalar planktonik hücre olarak düşünülmüş ve zengin besiyeri ortamlarında sergiledikleri büyüme ve gelişme faktörlerine göre tanımlanmışlardır. İlk Van Leeuwenhoek tarafından bildirilen "mikroorganizmaların bir yüzey üzerinde tutunarak yaşayabildikleri" şeklindeki mikrobiyolojik fenomenin tekrardan keşfedilmesi ile yapılan çalışmalar, yüzeye tutunabilen mikroorganizmaların (biyofilmler) gen transkripsiyonu ve büyüme-gelişme hızları bakımından farklı bir fenotip sergilediğini ortaya koymaktadır. Dağlardaki akarsuların içinde hayatını sürdüren bakterilerler incelediğinde %99.99'unun belirli bir yüzeye tutunarak, balçığa benzer bir yapı içinde yaşadıklarına rastlanmıştır. Daha önceki sürdürülen çalışmaların da sayesinde, bu toplulukları isimlendirmek amacı ile biyofilm terimi kullanılmıştır. Biyofilmler, matriks içinde hayatını sürdüren hücrelere, besinlerin ve oksijenin taşınmasına olanak sağlayan "su kanallarına" sahip, çok tabakalı olan heterojen bir oluşuma sahiptirler. Hücre dışı ekstrasellüler polimerik matriksi oluşturan polisakkarit, protein, DNA ve su kanallarından oluşan biyofilm, mikroorganizmaların tutunmasını ve korunmasını sağlar (Stapper ve ark., 2004). Biyofilm, bakterinin yüzeyinde oldukça düzensiz şekilde dağılmış polisakkarit bir matrikstir. Bu matriksin yoğunluğu sadece içerdiği hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değiştiği gibi mikroorganizmaların türleri arasında da farklılık göstermektedir.

Biyofilm oluşunun içindeki bakteriler, antibiyotik ve çeşitli dezenfektanlara karşı herhangi süspansiyon içerisindeki planktonik formlara göre daha dirençli oldukları bilinmektedir. Ekzopolimerik karmaşıklıktan meydana gelen fiziksel bariyer, mikroorganizmaları korur ve aynı zamanda içinde barındırdığı DNA parçalarıyla genetik çeşitlilik ve antibiyotiklere karşı duyarsız yeni bakteriyel suşların oluşumuna neden olduğu yapılan araştırmalar ortaya koymuştur. Biyofilm matriksi içerisinde gömülü olan farklı bakteri türleri arasında antibiyotiklere karşı dirençli suşların oluşumu, konjugasyon ve transformasyon mekanizmaları kullanılarak gerçekleştiği bilinmektedir (Kavanaugh ve ark., 2008).

İçinde barındırdığı organizmaya bağlı oluşan biyofilm matriksinde farklı özelliklere sahip olabilmektedir. Gram negatif (-) bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilm yaptığı ve Gram pozitif (+) bakterilerin katyonik matriks oluşturduğu bilinmektedir. Degradasyon kelimesi anlam olarak parçalanma olarak bilinmektedir. Burdan yola çıktığımızda biyofilm degradasyonu ise bir araya gelerek oluşan biyofilmin daha basit ve daha küçük yapılara ayrışarak miktar olarak azalma veya tamamen ortamdanda yok olmasına neden olmak demektir. Biyofilmler tıpta çeşitli hastalıklara, endüstride bazı problemlere, çevresel ve tarımsal alanda birçok zarara neden olmaktadır. Mikrobiyal biyofilm, steril olma gereksinimi en yüksek olan klinik ve endüstri ortamlarında büyük bir sorun teşkil etmektedir (Kavanaugh ve ark., 2012).

Biyofilmlerin en önemli zararlı etkileri; korozyon, hidrasyon ve penetrasyon ile renk değişimidir. Sulu sistemlerinde biyofilm oluşumu suda bulunan mikroorganizma miktarını önemli derecede arttıran rezervuar gibi çalışmasına neden olmaktadır. Bu mikrobiyal oluşum bazen kötü bir koku oluşturabilir ve sistemden geçen su içerisinde biyofilm materyalinin kalıntıları gözle görülebilir. Biyofilmden oluşan kopmalar, bazı enfeksiyonların meydana gelmesine ve sulu sistemlerin uzak bölgelerindeki oluşacak kontaminasyonunda klinik ve halkın sağlığı açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Biyofilm, mikrobiyal enfeksiyonla yanı sıra birçok endüstriyel üretimin olduğu tesislerde ürünlerin kontaminasyonuna, ekipmanlarda hasara sebebiyet, üretimde oluşan düşüşler ve artacak enerji tüketim giderlerinden dolayı oldukça yüksek miktarda maliyet artışına neden olmaktadır. Biyofilm kontaminasyonu ve oluşacak kirliliği hemen hemen bütün su arıtım ve dağıtımındaki su ile alakalı endüstriyel prosesler de oldukça sık rastlanmaktadır. Biyofilmler aynı zamanda akciğere benzer dokularda, medikal de kullanılan cihazlarda, endüstriyel anlamda veya evsel olarak su taşıma borularında veya herhangi doğal su süreçlerini gerçekleştiren sistemler gibi geniş çeşitlilik içeren yüzeylerde ve sistemlerde meydana gelebilmektedir. Su sistemleri düzeneğinde oluşan biyofilm tıp, endüstri ve günlük hayatta çok ciddi problemlere sebep olmaktadır. Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotik ve dezenfektanlara karşı direnci oldukça yüksektir (Donlan ve Costerton 2002).

Biyofilm tabakasının bütün bu dezavantajlarının yanı sıra çeşitli pek çok avantajı bulunmaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, karasal ve bentik alanlardaki besin döngülerinde ve çevresel atıklardan oluşan kirliliklerin biyolojik olarak yıkımında kritik bir rol almaktadır. Doğal su sistemlerinde yüzeyde oluşan mikroorganizmalar, organik bileşenleri parçalayarak ve ksenobiyotikleri detoksifiye ederek, suyun kalitesini korurlar. Ayrıca biyofilmler, toprakta bulunan ve çevresel açıdan oldukça tehlikeli kabul edilen bileşikler parçalayabilirler, biyoreaktörlerde kullanılabilirler veya mineral cevherlerinden kömür partiküllerinin birbirinden ayrılmasında kullanılabilirler. Ek olarak mikrobiyal biyofilmlerin metabolik aktivitesi, atık su arıtımında, lağım suyu arıtım uygulamalarında, fermentasyon süreçlerinin bir çeşidi için biyoteknolojide de kullanılmaktadır (Bos ve diğ., 1999, Gilbert ve diğ., 2003).

Esansiyel yağlar bitkilerin kokulu bileşenleridir ve önemli konsantrasyon da izopropen bileşimlerini içeren ikincil metabolitlerdir (Filoche ve ark., 2005). Esansiyel yağlar günlük hayatta kullanım alanı bakımından oldukça büyük bir yere sahiptir. Kullanım alanı o kadar yoğundur ki kullandığımızın farkına bile varmadan hayatımızın bir parçası haline gelmiştir. Örneğin; gıda sanayinde tatlandırıcı ve gıda katkı maddesi olarak, tütün ürünlerini tatlandırma da, kozmetik ürünlerde ve parfüm içeriğinde, oda ve araba kokularında, deodorant bileşenlerinde, tıbbi ilaç sanayisin de, masaj yağlarında, buhar terapilerinde, biyosit ve böceksavar ürünler de kullanıldığı gibi aynı zamanda kimyasal sentezlerde başlangıç materyali olarak ticari bir potansiyele sahiptir. Esansiyel yağlar ile tedavi yöntemleri uzun yıllardır bilinmektedir.

Bitkiden elde edilen esansiyel yağlar; bakteri, fungus ve virüs gibi mikroorganizmalar ve çeşitli birçok patojenle mücadele de doğal ilaç olaraktan uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Esansiyel yağlar, hücre duvarı ve hücre membranına zarar vererek hücrenin parçalanmasına neden olur ve bulunan hücre içeriğini dış ortama aktararak proton motive güç inhibisyonu ile antimikrobiyal bir aktivite göstermesini sağlar. Bunun yanı sıra, direnç sağlamasına neden olmadan etkili bir biçimde bakterileri öldürdükleri ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak bitkilerden esansiyel yağların eldesi oldukça kolaydır, su ve toprakta oldukça kolay indirgenirler bu durum onları kısmen çevre dostu yapmaktadır (Kavanaugh ve ark., 2008). Son zamanlarda antimikrobiyal özellikleri, düşük toksite riski ve çevreye daha duyarlı olması nedeniyle esansiyel yağlar ve bunların temel bileşenleri gibi doğal bitki koruyucuları, kimyasal uygulamalara alternatif olarak kullanılabilmektedirler (Isman, 2000; Kalemba ve Kunicka, 2003; Burt, 2004).

Yürütülecek olan bu çalışmada oluşturulan mikrobiyal biyofilmi degrede etmede, karanfil ve adaçayından elde edilen esansiyel yağların etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda anti biyofilm oluşumu ile ilgili çalışmalar olmasına karşın oluşturulan biyofilmi degrede etmeye yönelik çalışmalara yapılan literatür araştırmasında rastlanmamıştır. Bu araştırma sayesinde biyofilmi degrede etmeye yönelik elde edilen sonuçlar bilime kazandırılarak daha sonraki bu alanda yapılacak olan çalışmalara ön bilgi sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Genel Özellikleri

Yürütülen bu çalışmada oluşturulan mikrobiyal biyofilmin degradasyonunda etkisinin araştırılması üzerine *Syzygium Aromaticum* (*S. aromaticum*) ve *Salvia Officinalis* bitkisinden elde edilen esansiyel yağlar kullanılmıştır.

2.1.1 *Syzygium Aromaticum* (Karanfil)

Karanfil ağacı, bitkiler aleminin Mersingiller familyasına aittir. Pek çok kaynakta karanfilin *Syzygium* cinsinden *aromaticum* türünden olduğuna yer verilmiştir (Attokaran 2011).



Şekil 2.1. *Syzygium Aromaticum* (Karanfil) bitkisinin genel görünüşü



Şekil 2.2 Kurutulmuş karanfil (*Syzygium Aromaticum*) bitkisinin genel görünüşü

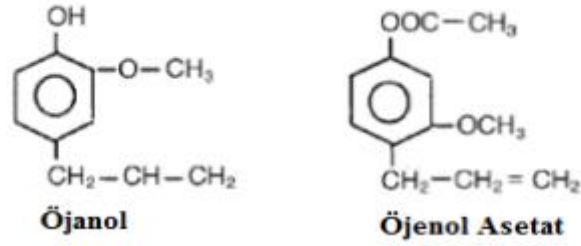
Antioksidan ve antimikrobiyal etkisi sayesinde oldukça sık kullanılan *Syzygium aromaticum* (*S. aromaticum*), bitkisinin diğeri adı *eugenia caryophyllata*'dır.

S. aromaticum bitkisi, *Mirtaceae* familyasında bulunan değeri bir türdür. Endonezya'da bulunan Maluku adalarına özgü olan bu bitki *S. aromaticum*, 8-12 m boylarında, yapraklarını dökmeyen, demetler şeklinde bulunan pembe çiçekler halinde ve yaz-kış daima yeşil olan bir ağaç türüdür. Ağacın pembe ve demetler şeklinde bulunan çiçeklerinin kurutulması sonucu elde edilen tomurcuklara karanfil adı verilmektedir. Deniz seviyesinin en fazla 200 m yüksekliğinde bulunabilen ve kıyı bölgelerinde yetişen karanfil ağaçları, eski dönemlerden bu zamana kadar kullanılan çok değeri bir bitkidir. Kozmetik sektöründe, gıda sanayisinde, tıpta ve ilaç sanayisinde oldukça geniş bir kullanım alanının yanında, hoş kokusu ve verdiği aroma için aynı zamanda dünya ticaretinde de önemli bir yere sahiptir (Kamatou, Vermaak, Viljoen 2012; Cortés-Rojas, Souza, Oliveira 2014).

Karanfil, çoğunlukla bitkinin tomurcuklarından elde edilmektedir fakat çiçek ve yapraklardan da elde edilebilmektedir. Karanfil bitkisi, yapısında yoğun olarak fenolik asit (%85) içermektedir. İçeriğinde en fazla miktarda bulunan fenolik asit gallik asit ve tanenlerdir. Bunun yanı sıra yapısında kafeik asit, ferulik asit, elagik asit ve salisilik asit bulundurmaktadır.

Karanfil içinde barındırdığı fenolik asitlere nazaran daha düşük yoğunluk da çeşitli flavonoidleri de içinde barındırmaktadır. İçeriğinde bulunan flavonoidlere; kaempferol, kersetin ve türevleri örnek verilebilir.

Çiçek ve tomurcuklardan elde edilen karanfil esansiyel yağının etken maddesi öjanoldür (*eugenol*). Yağın %75-85'ini oluşturan öjanolün yanında etken özellik gösteren maddeler %5-%15'ini oluşturan öjanol asetat ve β -karyofilenol'dur. Karanfil esansiyel yağında yaklaşık %2 oranında bulunan α -humulen önemli etkiler gösterebilmektedir. Bunlarla birlikte β -pinen, limonen, farnesol, benzaldehit, 2- heptanon ve etil heksanoat karanfil esansiyel yağının yapısında eser miktarlarda bulunan uçucu bileşiklerdir (Cortés-Rojas et al 2014, Hepokur 2018, Çoban ve Patır 2010).



Şekil 2.3 Öjenol ve öjenol asetat moleküler yapısı (Çoban ve Patır 2010)

Karanfilin bileşenleri yetiştirme ortamı, uygulanan proses, depolama alanı gibi agro-klimatik sebeplere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Kurutulmuş karanfil tomurcuğu karbonhidrat, sabit yağ, uçucu yağ, rezin, tanen, protein, selüloz, pentozan ve mineral maddeler içerir (Parthasarathy vd. 2008).

Bileşim	ABD Tarım Bakanlığı (USDA) (öğütülmüş)	Amerikan Baharat Ticaret Birliği (ASTA)
Su	6.86	5
Enerji (kcal)	323	430
Protein (g)	5.98	6.0
Yağ (g)	20.06	14.5
Karbonhidrat (g)	61.22	68.8
Kül (g)	5.88	5.0
Kalsiyum (g)	0.646	0.7
Fosfor (mg)	105	110
Sodyum (mg)	243	250
Potasyum (mg)	1102	1200
Demir (mg)	8.68	9.5
Tiamin (mg)	0.115	0.11
Riboflavin (mg)	0.267	–
Niasin (mg)	1.458	1.5
Askorbik asit (mg)	80.81	81
Vitamin A aktivitesi	53	53

Çizelge 2.1 Karanfilin (100 g) besin maddeleri bileşimi (Peter 2001)

2.1.2 *Salvia Officinalis* (Adaçayı)

Salvia cins ismi eski zamanlara dayanan iyileştirici özelliklerinden dolayı Latince “*salvare*” yani “kurtarmak, iyileştirmek” anlamındaki sözcükten köken almaktadır. *Salvia officinalis* Güney Avrupa ve Asya’da doğal olarak yayılım gösteren tek yıllık çalı formunda 30-70 cm. boyunda bir bitkidir. Halka dizilişli menekşe renkli çiçekleri ve karşılıklı dizilişli beyaz yaprakları vardır. Bitkinin Türkiye, İtalya, Yunanistan, Yugoslavya, İspanya ve Fransa’ da kültürleri yapılmıştır.



Şekil 2.4 *Salvia Officinalis* (Adaçayı) bitkisinin genel görünüşü

Türkiye de bulunan *Salvia* bitkisinin türleri, halk arasında değişik ve farklı isimlerle anılmaktadır; adaçayı, meryemiye, elma çalpası, gibi isimlerle bilinmektedir. *Salvia* türlerinin genel özellikleri; gaz söktürücü, mide rahatsızlıklarında rahatlatıcı, ter kesici ve idrar söktürücü olarak bilinmektedir. Bu özelliklerin yanı sıra oluşan yaraları iyileştirmede ve antiseptik olarak da kullanılmaktadırlar.

Türkiye de *Salvia* familyasının 97 tür, 4 alt türü bulunmaktadır. 8 *Salvia* türünün 51 tanesi ülkemizde endemiktir. Bu türlerin Türkiye'deki fitocoğrafik olarak bulundukları yerler; 58 tanesi (% 59,7) İran-Turan, 27 tanesi (%27,8) Akdeniz, 5 tanesi (%5) Avrupa-Sibirya, kalan 7 tanesi ise (%7) birden fazla fitocoğrafik bölgede bulunmaktadır (Akıcı, 2018; Doğan, 2008).

Antioksidan özelliklerinden dolayı *salvia* türleri gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır (Tel vd., 2010 ; Akıcı, 2018; Doğan vd., 2008). *Salvia* türleri halk arasında çoğunlukla ilaç olarak kullanımı yaygındır. Literatür araştırmaları *Salvia* türlerinin antibakteriyel, antiviral, antitüberküloz, sitotoksik, kardiyovasküler ve karaciğeri koruma etkisinin de olduğuna rastlanmıştır.

Salvia cinsinin Türkiye için endemiklik yüzdesi yaklaşık olarak % 50' dir. Adaçayı bitkisinin çeşitleri Akdeniz Havzasında ve Anadolu' da eski zamanlardan beri baharat olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kurak alan ve taşlı bölgelerde, kireçtaşı alanlarında ve çok az toprağa sahip kayalıklarda yetişebildiği görülmüştür. Bitki, güneşi iyi alan ve iyi drene olan kumlu topraklara ihtiyaç duyar. Adaçayı, genelde sıcak seven bir yapı göstermektedir (Büyükkaya, 2002).

Esansiyel yağ kompozisyonlarıyla yapılan araştırmalardan elde edilen veriler *Salvia* türlerinin karakterize edilmesinde en önemli parametrenin α -tujon, β -tujon ve kamfor içerikleri olduğu sonucunu vermiştir (Langer, Mechtler, & Jurenitsch, 1996).

Salvia officinalis yaprağında 79'dan fazla aktif madde varlığına rastlanmıştır ve bunlar uçucu yağlar, triterpenler, hidroksisinamik asit türevleri, fenolik diterpen, flavonoidler, fenolik glikozitler, polisakkaritler ile diğer bileşenler olmak üzere sekiz grupta sınıflandırılmaktadır (Bernotiene et al., 2007; Grieve and Leyel, 1992). Ayrıca, *ahumulen*, β -kariyofil ve *viridiflorol* gibi seskuiterpen maddeler de içinde bulunmaktadır (Çizelge 2.2).

Uçucu yağ bileşenleri	%	Uçucu yağ bileşenleri	%
limonene	3.54	myrtenol	0.26
1,8-cineole	17.83	carveol	0.10
linalool	0.20	ledol	0.95
α -thujone	13.82	γ -selinene	3.73
β -thujone	5.96	caryophyllene oxide	1.06
β -pinene	0.27	santolina triene	0.19
caryophyllene	3.86	spathulenol	0.47
γ -elemene	0.20	humulene epoxide	1.02
(Z)-pinocamphone	0.31	myristicin	0.13
camphor	26.38	isoaromadendrene epoxide	0.31
humulene	4.59	α -santalol	0.11
camphene	0.25	trans-Z- α -bisabolene epoxide	0.25
α -terpineol	1.50	caryophyllene (I3)	1.10
borneol	3.06	manoyl oxide	5.46
α -terpinyl acetate	2.02	β -selinene	0.45
geranyl acetate	0.21	Toplam bulunan bileşenler	92.45

Çizelge 2.2 *Salvia officinalis* Linnaeus 'de bulunan aktif maddeler (Said-Al Ahl et al., 2015)

2.2 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Yürütülen bu çalışmada biyofilm yapan mikroorganizmalar arasından 10 farklı bakterinin biyofilm yapma yeteneklerine bakılmıştır. Aralarından en iyi biyofilm yaptığı gözlenen *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) ve *Enterococcus faecalis* (ATCC 29122) bakterileri kullanılmıştır.

Test Edilen Bakteriler

Suş Kodu	Tür adı	ATCC
HPB 36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
HPB 37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27859
HPB 42	<i>Enterococcus faecalis</i>	29122
HPB 51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
HPB 53	<i>Enterococcus faecalis</i>	51299
HPB 54	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
HPB 57	<i>Enterococcus faecalis</i>	29121
HPB 58	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
HPB 52	<i>E.coli</i>	35218
HPB 55	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas cinsine ait bakteriler, *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde bulunmaktadır. Bu bakterilerin büyük bir çoğunluğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Bazı türleri insan, bitki ve hayvan patojeni olarak bilinmektedir. Oldukça önemli bir yere sahip olan bu cinsin türlerinin bir kısmı oksidaz pozitif, bir kısmı oksidaz negatiftir. Glikozu oksidasyon ile parçalayan fakat aynı zamanda fermentasyon yapmayan bakterilerdir.

P. aeruginosa genellikle toprakta, suda ve bitkilerde yaşayan bir mikroorganizmadır. Çoğunlukla tek tek görülen, 0,5 - 0,8 mm eninde 1,5 - mm boyunda, sporsuz, uç kısmında tek, nadiren 2-3 kirpik bulunan, çok hareketli, Gram negatif bir basildir (Bilgehan, 2002).

Optimum gelişme sıcaklığı 25°C - 37°C arasında değişmektedir, daha yüksek ve düşük sıcaklıklarda zor hayatta kalır. 4°C de üreyemez, 42°C'de üreme yeteneğindedir ve bu özelliği ile diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmaktadır (Iglewski, 1996).

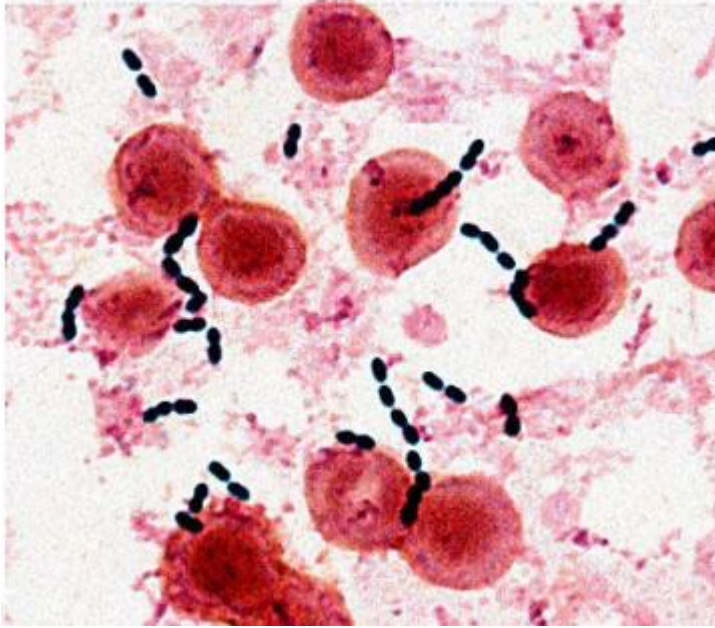
Pseudomonas aeruginosa mikroorganizmasının kökenleri antibiyotiklere karşı yüksek direnç göstermektedir ve çoğu zaman çoklu ilaç direncine de sahiptir. Dirençli ve çok virülen *P. aeruginosa* bakterisinin sebep olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar dünya çapında çok büyük probleme neden olmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bu enfeksiyonların morbidite ve mortalite oranları oldukça yüksektir. Nozokomiyal bakteriyel enfeksiyonların % 65'inden biyofilm kabiliyetine sahip olan bakteriler sorumludur. Nozokomiyal enfeksiyonların kontrolünde, hastane ortamındaki biyofilmle savaşacak etkili yöntemleri geliştirmek kritik bir öneme sahiptir.

2.2.2 *Enterococcus faecalis*

Günümüzde enterokok olarak bilinen grup daha önceleri fekal kökenli streptokok olarak bilinmekteydi. İlk olarak Fransa'da Thiercelin tarafından yayınlanan bir makalede intestinal orijinli Gram pozitif koklar olarak enterokoklar tanımlanmıştır. *Streptococcus faecalis* ismi ilk kez 1906 yılında Andrewes ve Holder tarafından endokarditli bir hastadan izole edilen mikroorganizmalar için kullanılmıştır (Murray 1990).

Enterokoklar aerop ve anaerop ortamlarda optimal olarak 35 °C ve 10-45 °C arasında bulunan geniş aralıkta bulunan sıcaklıkta ürer. Enterokoklar besin ihtiyaçları bakımından zenginleştirilmiş koyun kanlı agar besiyerinde üremelerini destekler.

Enterokokların sitokrom enzimi bulunmadığından katalaz negatif olarak bilinmektedir. Fakat *E. faecalis* kan içeren bir besiyerinde üretildiği zaman bazen zayıf bir psödokatalaz reaksiyonu gösterebilir. Kanlı agarda 24 saat inkübasyona bırakıldığı zaman geniş beyaz koloni meydana getirmektedir. İsminden de anlaşıldığı gibi enterokoklar çoğunlukla insan ve hayvanların dışkılarından soyutlanan enterik patojen olarak tanımlanmaktadır. *E. faecalis* genitoüriner sistemde ve kalın bağırsakta yüksek konsantrasyonda bulunabildiği gibi (Murray Patrick R, Rosenthal Ken S, 2008), ağız içi, gingival sulkus ve kök kanal enfeksiyonlarının ilk fazlarından da soyutlanmıştır (Stuart ve ark., 2006).



Şekil 2.5 Kan kültüründe *E. faecalis* (Murray Patrick R, Rosenthal Ken S, 2008)

2.3 Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Antibiyotikler

2.3.1 Gentamisin

Gentamisin oldukça önemli bir aminoglikozid antibiyotik olup, hayvanlarda ve insanlarda en başta gram negatif bakteriler olmak üzere birçok farklı mikroorganizmaya karşı sıklıkla kullanılan bir antibiyotiktir. Fakat kullanımına ilişkin en önemli kısıtlayıcı özelliği yüksek toksisite etkisidir. En çok nefrotoksisite, ototoksisite, nöromusküler blokaj meydana getirir. Nefrotoksisite, tüm aminoglikozidlerde gelişebilen ve aminoglikozid kullanımında % 5-10 oranında saptanabilen bir yan etkidir (Willke ve ark., 2003).

2.3.2 Eritromisin

Eritromisin antibiyotiği 1952 yılında keşfedilmiş olup, daha önceleri *S. erythreus* olarak bilinen fakat günümüzde *S. erythraea* olarak adlandırılan bakteriler tarafından üretilmektedir (Liu vd., 2013).

Eritromisin boğaz ve sinüs, akciğer, kulak, ağız ve diş, deri ve doku, mide ve bağırsak, göz ve yanıklar, ameliyatlar, romatizmal ateş, bakteriyel kalp içi zarı iltihabı veya dental işlemler gibi enfeksiyonların önlenmesinde kullanılmaktadır (Brittain, 1987; Moreno vd., 1995).

2.3.3 Tetrasiklin

Tetrasiklinler Gram (+) ve Gram (-) aerob ve anaerob bakteriler üzerinde etki gösterirler. Geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Bakteri hücresinde protein sentezini engelleyerek bakteriyostatik etki oluştururlar. *Tetrasiklin*, *oksitetrasiklin* ve *klortetrasiklin* benzer özelliklere sahiptir. Bakteriyel enfeksiyonlarda *oksitetrasiklin* daha çok kullanılmaktadır (Reybroeck, 2010; Yarsan, 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitkiler

Yürütülen çalışmada oluşturulan mikrobiyal biyofilmin üzerinde etkisini araştırılmasına yönelik *Salvia Officinalis* ve *Syzygium Aromaticum* bitkisi kullanılmıştır.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada; *Pseudomonas aureginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 29122 biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek olduğundan bakterileri suşları kullanılmıştır. Kullanılan bakteri suş kodları ve tür adları tablo 3.1 de verilmiştir.

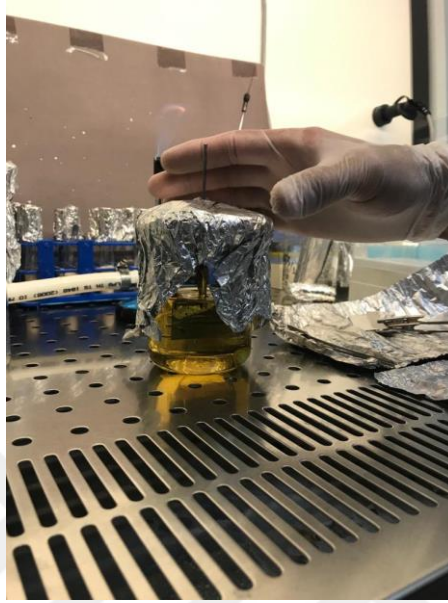
Mikroorganizmaların Suş Kodları	Mikroorganizmaların Tür Adları
HPB -36	P. aureginosa ATCC 9027
HPB-42	Enterococcus faecalis ATCC 29122

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Suş Kodları ve Tür Adları

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Mikrobiyal Biyofilm Oluşturulan Yüzey Aparatları

Çalışmada 3 farklı malzeme (Krom, Cam, PVC) üzerinde biyofilm oluşumu sağlanmıştır.

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Mikrobiyal Biyofilm Oluşturma İçin Tasarlanan Düzenek



Beher içersine %1 'lık Glukoz çözeltisi ile hazırlanan Nutrient Broth (NB) besiyerinin içine kullanılacak olan cam, Krom, PVC malzemesi tasarlanan aparat ile yüzeye yakın şekilde askıda kalarak durması amaçlanmıştır. Bu sayede yüzeyde oluşan biyofilm, malzeme üzerine yapışarak daha sonraki aşamalara aktarılması gerçekleştirilmiştir.

3.1.5 Çalışmada Kullanılan Solvent ve Genel Besiyerleri

Çalışmada mikrobiyal biyofilm oluşturmada %1 Glukoz çözeltili Nutrient Broth (NB), kullanılacak bakterileri yetiştirme de genel besiyeri olarak Nutrient Agar (NA) ve biyofilm degradasyonunda farklı konsantrasyonlarda esansiyel yağların bulunduğu Dimetil sülfoksit (DMSO) solventi kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1 Esansiyel Yağların Elde Edilmesi

Toplanan ada çayı, ilk olarak oda sıcaklığında güneş ışınlarına maruz kalmayacak şekilde kurutulmak üzere bırakılmıştır. Kuru hale gelen bitkiler Blender cihazı ile toz haline getirilmiştir. Toz halinde olan bitkilerden 100 g olarak tartımı gerçekleştirilerek Clevenger cihazında 1.5 L su içerisinde, 100 °C de yaklaşık 4 saat kaynatılarak esansiyel yağ elde edilmiştir.



Tablo 3. 2 Biyofilm degradasyonunda kullanılan çözelti içerikleri

3.2.2 Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanması

Nutrient Agar (NA) bakteriler için sıklıkla kullanılan genel bir besiyeridir. 1 litrede 20 g/l olacak şekilde hassas terazide tartımı gerçekleştirilip distile su içerisinde karıştırılıp eritilerek 121 °C de 15 dakika otoklava koyulmuştur. Steril edilmiş NA besiyerinin sıcaklığı 45-50 °C geldiğinde petri kaplarına her biri 20 ml olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Hazırlanan NA besiyeleri bakterilerin yetiştirilmesinde ve disk difüzyonunda kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin pH' ı 25 °C de 7±0,2 dir.

3.2.3 Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanması

Nutrient Broth (NB) bakteriler ve mayalar için sıklıkla kullanılan sıvı besiyeridir. Nutrient Broth (NB) distile su içerisinde 8 g/L olacak şekilde karıştırılıp eritildikten sonra 121' °C de 15 dakika otoklava koyulmuştur. Hazırlanan NB besiyerlerinin bir kısmı %1'lik glukoz içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerler bakteri yetiştirilmesinde ve biyofilm oluşturma aşamasında kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin pH' ı 25 °C de 7±0,2 dir.

3.2.4. Biyofilm Degredasyon Çözeltisinin Hazırlanması

4 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler, esansiyel yağ içeriğine göre farklı konsantrasyonlar belirlenmiştir.

1. konsantrasyon: 75 ml DMSO

75 ml Distile su

750 µl EO

3.konsantrasyon: 75 ml DMSO

75 ml Distile su

187,5 µl EO

4.konsantrasyon : 75 ml DMSO

75 ml Distile su

93,75 µl EO

	DMSO	Distile su	Esansiyel Yağ
1. konsantrasyon	75 ml DMSO	75 ml Distile su	750 µl EO
2. konsantrasyon	75 ml DMSO	75 ml Distile su	350 µl EO
3. konsantrasyon	75 ml DMSO	75 ml Distile su	187,5 µl EO
4. konsantrasyon	75 ml DMSO	75 ml Distile su	93,75 µl EO

3.2.5 Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak bakteriler hazırlanan NA besiyerlerine ekimi gerçekleştirilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 4 farklı konsantrasyon için 4 steril edilmiş behere daha önceden hazırlanmış ve steril hale getirilmiş %1 glukoz çözeltisi içeren NB besiyeri her behere 150 ml olacak şekilde koyulmuştur. İçerisine steril balık atılarak mikrobiyal biyofilm oluşturulacak malzeme yüzeyde tutma aparatı ile tutturularak besiyerinin yüzeyinde duracak şekilde ayarlanmıştır. Düzeneğin ağzı kapatılarak 72 saat manyetik karıştırıcı üzerinde 37 °C ve 100 rpm hızla inkübasyona bırakılmıştır.

Bu işlem her bakteri, her malzeme için (krom,cam,PVC) ve her EO için tekrarlamıştır. İnkübasyon süresinin sonunda malzeme üzerinde oluşan biyofilm degradasyon tayini yapmak için hazırlanan DMSO+Distile su+EO olan karışımın içerisine alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde 100 rpm hızla 24 saat bırakıldı. Ardından 600 nm'de spektrofotometrede OD değerleri kaydedilmiştir.

3.2.6 Disk Difüzyon Metodu

Disk difüzyonu yöntemi antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Disk difüzyonu yönteminde NA besiyeri kullanılmıştır. İlk olarak NA besiyerine, çalışmada kullanılan bakteriler yayma ekim tekniğine göre ekimi sağlanmıştır. Daha sonra bu yönteme göre 6mm çapındaki boş antibiyotik disklerine uygun koşullar altında 20 µl örneklerden emdirilmiştir. Bakteriler üzerinde disk difüzyon metodu uygulanırken ilk olarak OD(600nm)= 0.4 standardına göre spektrofotometre de ayarlanan bakteri kültüründen(2 mL NB + 18 µL bakteri eklenerek spektrofotometre de okutulmuştur ve OD(600nm) = 0.4 ayarlandı.) 100 µL alınarak NA besiyerine cam baget yardımı ile yayma ekim tekniğine uygun olarak ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekim yapıldıktan sonra çalışmada kullanılan EO3, EO4, EO3+EO4, DMSO boş antibiyotik disklerinin üzerine 20 µl emdirilmiştir.

DMSO çalışmada negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise Gentamisin, Eritromisin, Tetrasiklin kullanılmıştır. 37 °C' de 24 saat inkübasyon süresinden sonra disklerin yaptığı inhibisyon zonları ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)

Bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar (EO3, EO4, EO3+EO4 o.ü) %100'lük DMSO (750 µL EO+ 2ml DMSO) içinde çözölürölerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 10 tüpe daha önce hazırlanan NB besiyerinden 2' şer ml steril tüplere alındı. Hazırlanan stok çözeltiden 2 ml alınarak birinci tüpe koyulmuştur. Ardından seyreltme işlemi yapılarak her tüpten alınan 2 ml bir sonraki tüpe pipetlemesi yapılmıştır. 11. tüpe negatif kontrol olarak sadece 2 ml brot koyulmuştur. Ardından tüm tüplerin içlerisine OD(600nm)= 0.4 standardına göre spektrofotometre de ayarlanan bakteri kültüründen(2 mL NB + 18 µL bakteri eklenerek spektrofotometre de okutulmuştur ve OD(600nm) = 0.4 ayarlandı.) 100 µL bakteri inoküle edilmiştir. Bu işlem çalışmada kullanılan her iki bakteri için yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Biyofilm Degradasyon Spektrofotometre Ölçüm Sonuçları

4.1.1HPB42 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,190	0,162	0,103	0,010	0,010
0,192	0,158	0,90	0,020	0,010
0,190	0,164	0,105	0,020	0,000

4.1.2 HPB42 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,332	0,193	0,102	0,040	0,000
0,332	0,202	0,104	0,020	0,000
0,330	0,196	0,107	0,010	0,000

4.1.3 HPB42 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,757	0,580	0,318	0,204	0,020
0,769	0,559	0,360	0,238	0,000
0,804	0,604	0,344	0,220	0,000

4.1.4 HPB42 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,521	0,324	0,152	0,060	0,010
0,480	0,313	0,155	0,080	0,010
0,514	0,348	0,143	0,050	0,000

4.1.5 HPB42 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,350	0,200	0,102	0,010	0,000
0,325	0,196	0,105	0,020	0,000
0,314	0,200	0,110	0,020	0,000

4.1.6 HPB42 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,616	0,460	0,324	0,181	0,020
0,616	0,461	0,314	0,174	0,000
0,607	0,455	0,296	0,180	0,000

4.1.7 HPB36 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,307	0,216	0,168	0,030	0,010
0,308	0,210	0,171	0,040	0,010
0,302	0,210	0,176	0,030	0,000

4.1.8 HPB36 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,384	0,218	0,130	0,080	0,000
0,361	0,215	0,136	0,080	0,000
0,362	0,220	0,144	0,060	0,000

4.1.9 HPB36 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO3'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,568	0,350	0,230	0,124	0,020
0,564	0,354	0,225	0,117	0,000
0,560	0,342	0,238	0,120	0,000

4.1.10 HPB36 Bakterisinin Plastik Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,382	0,296	0,120	0,040	0,010
0,380	0,298	0,102	0,010	0,010
0,395	0,292	0,114	0,020	0,000

4.1.11 HPB36 Bakterisinin Cam Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,312	0,210	0,118	0,060	0,000
0,310	0,202	0,120	0,050	0,000
0,290	0,196	0,114	0,030	0,000

4.1.12 HPB36 Bakterisinin Krom Malzeme Üzerinde Oluşturduğu Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda EO4'ün Etkisinin Sonuçları

1.Konsantrasyon (750 µL EO)	2.Konsantrasyon (375 µL EO)	3.Konsantrasyon (187,5 µL EO)	4.Konsantrasyon (93,75 µL EO)	Kontrol Grubu (Esansiyel yağ kullanılmadan)
0,512	0,320	0,235	0,174	0,020
0,514	0,315	0,230	0,183	0,000
0,530	0,316	0,2442	0,166	0,000

4.1.13 Malzemeler Üzerinde Oluşturulan Mikrobiyal Biyofilmin Degradasyonunda Esansiyel Yağ Kullanılmadan Alınan Sonuçlar

Krom	Plastik	Cam
0,020	0,010	0,000
0,000	0,010	0,000
0,000	0,000	0,000

4.2 Disk Difüzyonu Zon Ölçümleri

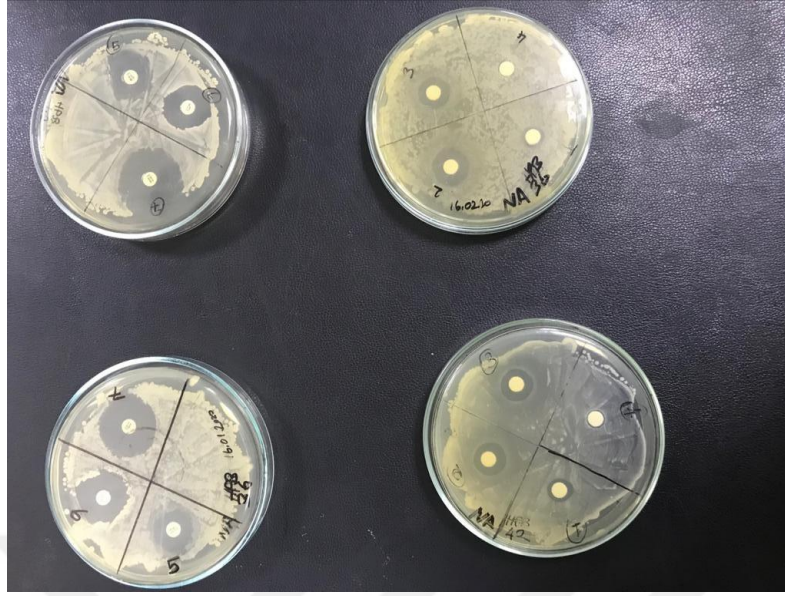
Disk difüzyonu metodunda bakteri inoküle edilmiş NA besiyerine yerleştirilen disklere, elde edilen esansiyel yağlar, pozitif kontroller ve negatif kontroller emdirilmiştir. Pozitif kontrol olarak antibiyotikler, negatif kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Bu metodun amacı inkübasyon sonrası zon ölçümlerinin karşılaştırılmasıdır. Esansiyel yağların etki mekanizmasının yorumlanması da elde edilen amaçlar dahilindedir.



Şekil 4.1 HPB 42 bakterisi disk difüzyonu metodu zon oluşumu

1	EO3
2	EO4
3	EO3+EO4
4	DMSO
5	Gentamisin
6	Eritromisin
7	Tetrasiklin

Tablo 3.3 Disk difüzyonunda kullanılan zon sıralamaları



Şekil 4.2 HPB42- HPB36 disk difüzyonu zon ölçümleri

Örnek	*Zon Ölçümleri (mm)
EO3	9 mm
EO4	16 mm
EO3+EO4	13 mm
DMSO (Negatif kontrol)	-
Gentamisin (Pozitif Kontrol)	25 mm
Eritromisin (Pozitif Kontrol)	21 mm
Tetrasiklin (Pozitif Kontrol)	29 mm

Tablo 4.2 HPB -42'nin elde edilen disk difüzyon sonuçları

* Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını vermektedir. EO3 ada çayından elde edilen esansiyel yağı temsil etmektedir. EO4: karanfilden elde edilen esansiyel yağ, DMSO Dimetil Sülfoksit (Negatif Kontrol), Antibiyotikler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. HPB 42 : Enterococcus faecalis ATCC 29122

Örnek	*Zon Ölçümleri (mm)
EO3	9 mm
EO4	17 mm
EO3+EO4	14 mm
DMSO (Negatif kontrol)	-
Gentamisin (Pozitif Kontrol)	26 mm
Eritromisin (Pozitif Kontrol)	21 mm
Tetrasiklin (Pozitif Kontrol)	26 mm

Tablo 4.3 HPB -36'nin elde edilen disk difüzyon sonuçları

* Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını vermektedir. EO3 ada çayından elde edilen esansiyel yağı temsil etmektedir. EO4: karanfilden elde edilen esansiyel yağ, DMSO Dimetil Sülfoksit (Negatif Kontrol), Antibiyotikler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. HPB 36: *P. aureginosa* ATCC 9027

4.3 Mic Değerleri Elde Edilen Sonuçları

Bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar (EO3,EO4, EO3+EO4 o.ü) %100'lük DMSO (750 µL EO+ 2ml DMSO) içinde çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 10 tüpe daha önce hazırlanan NB besiyerinden 2 şer ml steril tüplere alınmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 2 ml alınarak birinci tüpe koyulmuştur. Ardından seyreltme işlemi yapılarak her tüpten alınan 2 ml bir sonraki tüpe pipetlemesi yapılmıştır. 11. tüpe negatif kontrol olarak sadece 2 ml brot koyulmuştur. Ardından tüm tüplerin içerisine OD(600nm)= 0.4 standardına göre spektrofotometre de ayarlanan bakteri kültüründen(2 mL NB + 18 µL bakteri eklenerek spektrofotometre de okutuldu ve OD(600nm) = 0.4 ayarlandı.) 100 µL bakteri inoküle edilmiştir. Bu işlem çalışmada kullanılan her iki bakteri için yapılmıştır.

Kullanılan Bakteri - Esansiyel Yağ	*MIC Değeri
HPB- 36, EO3+EO4 Karışımı	8.tüp 5,85 µL/ml
HPB 36, EO4	8 .tüp 5,85 µL/ml
HPB 36, EO3	9.tüp 2,92 µL/ml
HPB 42, EO3+EO4 Karışımı	10. tüp 1,91 µL/ml
HPB 42, EO3	9.tüp 2,92 µL/ml
HPB 42, EO4	9.tüp 2,92 µL/ml

Tablo 4.4 MIC değeri elde edilen sonuçlar

* Verilen rakamlar dilisyon ile seyreltme yapılan konsantrasyon sonunda meydana gelen çoğalma sonucu bulunan rakamlardır. EO3 ada çayından elde edilen esansiyel yağı temsil etmektedir. EO4: karanfilden elde edilen esansiyel yağ, HPB 36: *P. aureginosa* ATCC 9027, HPB 42: *Enterococcus faecalis* ATCC 29122

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışmada *Syzygium Aromaticum* (Karanfil) ve *Salvia Officinalis* (Adaçayı) bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların, HPB 36 HPB bakterilerinin 3 farklı yüzeyde oluşturdıkları mikrobiyal biyofilmin üzerine etkisinin araştırılması, Disk difüzyonu ve MIC değeri metodlarına göre değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kullanılan esansiyel yağların, oluşturulan mikrobiyal biyofilmin degradasyonunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Hazırlanan 4 farklı konsatrasyonda, kullanılan esansiyel yağ oranına bağlı olarak yüksek konsantasyondan düşük konsantrasyona doğru biyofilm degradasyonunda da konsantrasyona bağlı bir azalma gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO solventi kullanılan örnekte degradasyona yönelik bir sonuç elde edilmemiştir buna ilişkin biyofilm degradasyonunda önemli olan faktörün kullanılan esansiyel yağ olduğu kanısına varılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kullanılan her iki mikroorganizmada en iyi biyofilm oluşturma yeteneği krom malzeme üzerinde gözlenmiştir.

EO4 esansiyel yağı kullanılarak elde edilen degradasyon sonuçlarına göre en yüksek değer 0,616 olarak, HPB 42 bakterisinin krom malzeme üzerinde oluşturduğu biyofilm tabaka üzerinde görülmüştür.

EO3 esansiyel yağı kullanılarak elde edilen degradasyon sonuçlarına göre en yüksek değer 0,757 olarak HPB bakterisinin krom malzeme üzerinde oluşturduğu biyofilm tabaka üzerinde görülmüştür.

Gerçekleştirilen çalışmada kullanılan esansiyel yağlar 4 farklı konsantrasyonda hazırlanmış olup esansiyel yağ oranı azaldıkça biyofilm degradasyonu da buna bağlı olarak azaldığı elde edilen sonuçlara göre ortaya koyulmuştur. DMSO ile hazırlanan solventte ise 0'a yakın değerler ölçülmesi degradasyonda esansiyel yağların olumlu bir etkisinin olduğunu göstermiştir.

Paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde termofilik basillerin biyofilm oluşumu üzerine bazı çalışmalar mevcut ve bu sonuçlar çelik, cam veya plastik materyaller gibi abiyotik yüzeylerde değişkenlik göstermektedir (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2009). 3 farklı malzeme (cam, krom, PVC) üzerinde oluşturulan biyofilmin degradasyonunda farklı sonuçlar elde etmenin, biyofilmin malzeme üzerine tutunma kabiliyetlerinin farklılığından ortaya çıkmıştır. Bu durumda en iyi biyofilm oluşturan malzemeler sırasıyla krom, PVC, cam malzeme şeklindedir.

Biyofilmlerin antibiyotiklere karşı direnç durumları ve biyofilm özellikleri ulusal ve uluslararası literatürde disk difüzyon testi ve kristal viyole boyama yöntemi ile belirlenmektedir. Yürütülen bu çalışmada disk difüzyonu methodu kullanılmıştır.

Disk difüzyonu methodunda elde edilen sonuçlara göre disklere emdirilmiş esansiyel yağların, kullanılan pozitif kontroller (*Gentamisin*, *Eritromisin*, *Tetrasiklin*) antibiyotikleri kadar olmasa bile oldukça yüksek değere sahip zon oluşturduğu gözlemlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan ve boş diske emdirilen DMSO solventinde ise herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir.

Biyofilmlerin antibiyotiklere karşı direnç durumları ve biyofilm özellikleri ulusal ve uluslararası literatürde disk difüzyon testi ve kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada *Alcea nobilis* subsp. *neilreichii* bitkisinin Gram pozitif, Gram negatif bakterilere ve *Candida albicans*'a olan etkileri araştırılmıştır. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada Burdur'dan elde edilen bitkinin kapitulum kısımlarından elde edilen uçucu yağlar 8-13 mm inhibisyon zon aralığında sonuçlar verirken, Eskişehir'den toplanan bitkiler için 10-16 mm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Yürüttüğümüz bu çalışmada da yaklaşık olarak bu değerlere yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Karanfilden elde edilen esansiyel yağın, adaçayından elde edilen esansiyel yağa göre daha büyük zon oluşumu gözlenmiştir. HPB-36 bakterisi kullanılarak yapılan disk difüzyonu sonucuna göre en yüksek çapa sahip zon ölçümü pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin, tetrasiklin antibiyotiklerinde 26 mm olarak ölçülmüştür. Bunun yanı sıra kullanılan EO4 emdirilen disk etrafında oluşan zon ölçümü ise 17 mm'dir. EO3 emdirilen disk etrafında oluşan zon ölçümü ise 9 mm'dir. EO3+EO4 karışımı olarak emdirilen disk etrafında ise 14 mm zon oluşumu gerçekleşmiştir.

HPB-42 bakterisi kullanılarak yapılan disk difüzyonunda en yüksek zon ölçümü 29 mm çapında tetrasiklin antibiyotiğinde oluşmuştur. Kullanılan EO4 esansiyel yağı emdirilen disk etrafında 16 mm çapında zon oluşumu meydana gelmiştir. EO3 esansiyel yağı emdirilen disk etrafında ise 9 mm çapında zon oluşmuştur. EO3+EO4 karışımında ise 13 mm çapında zon oluşumu meydana gelmiştir. DMSO solventinde ise herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kullanılan esansiyel yağların HPB-36, HPB-42 mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Aka ST, Haji SH. Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine. *Braz J Microbiol* 2015; 46 (1): 149-154.
- Akıcı, N. (2018). Bazı *Salvia* türlerinin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.
- Alonso-Calderón, A., Chávez-Bravo, E., Rivera, A., Montalvo-Paquini, C., Arroyo Tapia, R., Monterrosas-Santamaria, M. & Tapia-Hernández, A. (2013). Characterization of black chia seed (*Salvia hispanica* L.) and oil and quantification of β sitosterol. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(1), 70-72.
- Altun, H., Şener, B., 2008. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci
- Badawy, M. E.I., Abdelgaleil, S. A.M. 2013. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi
- Başer, K.H.C., Buchbauer, G., Handbook of Essential Oils (Science, Technology, and Applications), CRC Press by Taylor and Francis Group, 978- 1-4200-6315-8,2010.
- Bernotienė, G., Nivinskienė, O., Butkienė, R. and Mockutė, D., 2007, Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.), *Chemija*, 18:38– 43 pp.
- Bhadoriya, U., Tiwari, S., Sharma, P., Bankey, S. and Mourya, M., 2011, Diuretic activity of extract of *Salvia officinalis*, *Asian J. Pharm. Life Sci.*, 1:24–8 pp.
- BOS, R., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J, 1999, Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol Rev*, 23, 179-230.
- BOSS, M. J. and DAY, D. W., 2003, Biological Risk Engineering Handbook: In fectionControl Legionella and Cooling Towers, CRC,Chapter 11.
- Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M. and Flint, S.H. 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3); 1012-1018.
- Burt, S. (2004). Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Brittain, D.C., 1987. Erythromycin, *Medical Clinics of North America*, 71, 1147-1154.
- Bruchmann J, Kirchen S, Schwartz T. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* wastewater isolates. *Environ Sci Pollut*
- Çoban E. Ö., Patır B. (2010). Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. Cilt: 5, No: 2, 2010 (7-19)
- Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*) a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014 Feb; 4(2): 90–96.

- Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L, 2006. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett*, 256(1), 145-50.
- Doğan, M., Pehlivan, S., Akaydın, G., Bağcı, E., Uysal, İ., & Doğan, H. M. (2008). Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia L. Labiatae*) Cinsinin Taxonomik Revizyonu. *Tübitak Proje*, (104).
- Donlan, R.M., Costerton, W.J., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8(9), 881-890.
- Estrada-Soto, S., González-Maldonado, D., Castillo- España, P., Aguirre Crespo, F., Sánchez-Salgado, J.C., 2010. Spasmolytic effect of *Mentha pulegium* L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips. *Journal Smooth Muscle Res.*, 46(2), 107- 117.
- Fabricius, L., Dahlén, G., Holm, S. E., & Möller, A. J. R. (1982). Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *European Journal of Oral Sciences*, 90(3), 200–206.
- Facklam RR, T. L. (1998). *Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections*, Vol 2 (Systematic Bacteriology) (9th edition b.). London: Collier L, Balows A, Sussman M.
- Filoché, S.K., Soma, K., Sissons, C.H., 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate.
- Flint, S.H., Ward, L.J. and Walker, K.M. 2001b. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S-23S internal spacer region. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4); 539-548.
- Fuse K, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Lida Y, Nukiwa T et al. Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* 2013; 19: 82-88.
- Gökbulut, I., Bilenler, T., Karabulut, I., 2013. Determination of Chemical Composition, Total Phenolic, Antimicrobial, And Antioxidant Activities of *Echinophora tenuifolia* Essential Oil. *International Journal of Food Properties*, 16:1442–1451.
- Grieve, M. and Leyel, C.F., 1992, *A Modern Herbal: The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folklore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs and Trees with All Their Modern Scientific Uses*, Tiger Books International, London, 859p.

- Guaraldi, A., Júnior, H.R., Azevedo, V., 2014. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species Genomics, Patogenicity and Applications. Springer, Chapter 2, 15 – 24.
- Filoché, S.K., Soma, K., Sissons, C.H., 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate.
- He, Y., Xu, T., Fossheim, L.E., Zhang, X.H., 2012. FliC, A Flagellin Protein, Is Essential for the Growth and Virulence of Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. Public Library of Science, 7(9), 45-70.
- Hepokur C. (2018). Investigation of cytotoxic effects of *Eugenia caryophyllus* (clove). Cumhuriyet Dental Journal: 2018; 21(3).
- Hmiri, S., Amrani, N., Rahouti, M., 2011. In vitro determination of antifungal activity of eugenol and essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Tanacetum annuum* L. against three fungi causing postharvest rot of apples. Acta Botanica Gallica, 158, (4), 609-616
- Isman, B.M. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19(8-10), 603-608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- Issabeagloo, E., Kermanizadeh, P., Taghizadieh, M., & Forughi, R. (2012). Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. African Journal of Microbiology Research, 6(23), 5039-5042. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.741>
- Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry, 10(10), 813-829.
- Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM. (2012). Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. Molecules. 17(6): 6953–6981.
- Lebon, A., Mailleret, L., Dumont, Y. and Grognaud, F., 2014, Direct and apparent compensation in plant–herbivore interactions, Ecological Modelling, Special Issue of the 4th International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications (PM12), 290:192–203 pp.
- Leppanen, C., Alyokhin, A. and Gross, S., 2012, Competition for aphid prey between different lady beetle species in a laboratory arena, Psyche J. Entomol., 12: 1–9 pp
- Liu, W.B., Yu, W.B., Gao, S.H. and Ye, B.C., 2013. Genome sequence of *Saccharopolyspora erythraea* d, a hyperproducer of erythromycin, Genome Announcements, 1, 1-2.
- Liu, Y., Wei, W.P. and Ye, B.C., 2018. High GC content Cas9-mediated genome-editing and biosynthetic gene cluster activation in *Saccharopolyspora erythraea*, ACS Synthetic Biology, 7, 1338-1348.

- Mattiacci, L., Dicke, M. and Posthumus, M.A., 1994, Induction of parasitoid attracting synomone in Brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: Role of mechanical damage and herbivore elicitor, *J. Chem. Ecol.*, 20:2229–2247 pp.
- Mejía-Torres S, Vega-García M, Valverde-Juárez J, López-Valenzuela J. & CaroCorrales J. (2009). Effect of wax application on the quality, lycopene content and chilling injury of tomato fruit. *Journal of Food Quality*, 32, 735-746. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00284.x>
- Moreno, S., Garcia-Leoni, M.E., Cercenado, M.D.D., Quiros, B. and Bouza, E., 1995. Infections caused by erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: Incidence, risk factors, and response to therapy in a prospective study, *Clinical Infectious Diseases*, 20, 1195-1200.
- Murray BE, 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, 3(1), 46–65. 67
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, 2005. *Medical microbiology*. 5 th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, p. 259-63.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, 2010. Enterokok ve diğer gram pozitif koklar. In: *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Ed: Başustaoglu AC, 6.baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık, p. 243-6.
- Murray Patrick R, Rosenthal Ken S, P. M. A. (2008). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. (Mosby, Ed.) (6. baskı).
- Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *J Iranian Microbiol* 2012; 4(3); 118-123.
- Sanchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Avalos, M., Guzman-Trampe, S., RodriguezSanoja, R., Langley, E. and Ruiz, B., 2010. Carbon source regulation of antibiotic production, *The Journal of Antibiotics*, 63, 442-459.
- Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*. 2003; 2(1): 48-62.
- Sharma H, Sudharshan S, Therese L, Agarwal M, Biswas J. (2016). *Candida albicans* Scleral Abscess in a HIV-positive patient and its successful resolution with antifungal therapy- a first case report. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 6 (1) ·December 2016 with 235 Reads DOI: 10.1186/s12348-016-0092-1.
- Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol* 2008; 57: 966-973.

- Soares, S. C., Ramos, R. T. J., Silva, W. M., Oliveira, L. C., Amorim, L. G., Hirata, R., Guaraldi, A. L. M., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., 2013. *Corynebacterium* pathogenic species in next-generation genomic era: the use of EDGAR and PIPS software and the importance of pathogenicity islands identification in pan-genomic analyses of pathogenic species. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 1584-1599.
- Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013; 4(3): 223-229.
- Stapper, A.P, Narasimhan, G., Mathee, K. 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2016, Article ID 3012462, 21 pages.
- Parthasarathy, V.A., Chempakam, B. ve Zachariah, T.J. 2008. *Chemistry of Spices*. CAB International, 445, India.
- Patterson, J. E., Sweeney, A. H., Simms, M., Carley, N., Mangi, R., Sabetta, J., & Lyons, R. W. (1995). An analysis of 110 serious enterococcal infections: Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine*, 74(4), 191–200.
- Perry, N.S., Bollen, C., Perry, E.K. & Ballard., C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 651-659. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00108-4)
- Peter, K. 2001. *Handbook of herbs and spices*. Woodhead Publishing Limited, 154-5, Washington.
- Raghavendran, K., Mylotte, J. M., & Scannapieco, F. A. (2007). Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: The contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontology* 2000. 44(1); 164-177.
- Rams, T. E., Feik, D., Mortensen, J. E., Degener, J. E., & van Winkelhoff, A. J. (2013). Antibiotic Susceptibility of Periodontal *Enterococcus faecalis*. *Journal of periodontology*, 84(7), 1026–1033. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120050>
- Ramsey, A. M., & Zilberberg, M. D. (2009). Secular Trends of Hospitalization With Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Infection in the United States, 2000–2006. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 30(2), 184–186.

- Reybroeck, W. (2010). Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor (Ph. D.) in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.
- Tel, Öztürk, M., Duru, M. E., Harmandar, M., & Topçu, G. (2010). Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food and chemical toxicology*, 48(11), 3189-3193
- Wang H, Tu F, Gui Z, Lu X, Chu W. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Microbiol* 2013; 53(2): 163-167.
- Yarsan, E. (2013). Hayvansal gıdalarda veteriner ilaç kalıntıları. Uluslararası 2. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 7-10 Kasım, Konya.
- Yarsan, E. (2017). Veteriner Hekimlikte Antibiyotikler. Pratik bilgiler rehberi. Güneş Kitabevi, Ankara.
- Yarsan, E. (2018). Veteriner ilaçları ve ilaçtan kaynaklanan sorunlar. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 58 (özel sayı):64-68.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dilara ÇİFTÇİ

Doğum Yeri ve Yılı: SİVAS, 1994

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

E-posta: dilara.ciftci.c@gmail.com

Eğitim Durumu

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik

Yüksek Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı