

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİMOL, EUGENOL, S- PERİLLİL ALKOLVE
KARVAKROL EKLENTİLİ YENİ OKSİPROPANOLAMİN
BİLEŞİKLERİNİN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alaa ALSHURAF

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Enstitü Bilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet KORÖĞLU

MAYIS- 2022

BEYAN

Bu alışma T.C. Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden 25/09/2022 tarihinde onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20/5/2022

Alaa ALSHURAF

TEŞEKKÜR

Tez konumu belirlememde ve devamını sağlamamda bilgi ve fikirleriyle her daim yanımda olan ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet KOROGLU'e, tez çalışmam sırasında yardım eden Dr. Tuğba AYHANCI'a teşekkür etmek istiyorum. Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Bölüm Başkanı Prof. Dr. Mustafa Altındış ve tüm öğretim kadrosuna (Dr. Öğr. Üyesi Tayfur DEMİRAY, Doç. Dr. Özlem AYDEMİR, Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ) teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olan, desteklerini bende hiçbir zaman esirgemeyen eşim Ahemd ALSHURAFa, annem Amnah ALSHURAFa, babam Adham ALSHURAFa, kardeşlerim ve tüm aileme gönülden minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	I
TEŞEKKÜR	II
KISALTMA VE SİMGELER	V
TABLolar	VI
RESİMLER	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ESANSİYEL YAĞLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.2. Esansiyel Yağların Sınıflandırılması	4
2.2.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	4
2.2.2. Biyolojik Aktivitelerine Göre Sınıflandırılması	5
2.2.3. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	5
2.3. ESANSİYEL YAĞLARIN ELDE EDİLME YÖNTEMLERİ	5
2.3.1. Damıtma	5
2.3.2. Solvent Ekstraksiyonu	6
2.3.3. Solventsiz Mikrodalga	6
2.3.4. Mekanik Yöntem (Presleme)	7
2.4. ESANSİYEL YAĞLARIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ	7
2.5. TİMOL, KARVAKROL, EUGENOL VE S-PERİLLİL ALKOL	8
2.6. MİKROORGANİZMALAR	11
2.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.6.2. <i>Escherichia coli</i>	13
2.6.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.6.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.6.5. <i>Enterococcus faecalis</i>	19
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	20
3.1. BAKTERİYEL KÜLTÜRLER	20
3.2. KİMYASALLAR VE STOK HAZIRLIĞI	20
3.3. MUELLER HINTON BROTH (MHB) HAZIRLANIŞI	20
3.4. % 0.9 SERUM FİZYOLOJİK HAZIRLANMASI	20
3.5. 0,5 MCFARLAND STANDARTLARINA GÖRE BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI	21
3.6. MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ	21
4. BULGULAR	22
4.1. TİMOL, KARVAKROL, S-PERİLLİL ALKOL VE EUGENOLÜN STANDART BAKTERİ SUŞLARINA KARŞI MİK BULGULARI	22
4.2. TİMOL, KRAVAKROL, S-PERİLLİL ALKOL VE EUGENOLÜN KLİNİK BAKTERİ İZOLATLARINA KARŞI MİK BULGULARI	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	24
KAYNAKLAR	30

ÖZGEÇMİŞ	41
----------------	----

KISALTMA VE SİMGELER

ARGs	: Antibiyotik ilaca dirençli genler
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
ECDC	: Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme
EY	: Essential yağ
EU/EEA	: Avrupa Birliği/Avrupa Ekonomik Alanı
EUO	: Eugenol
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FDA	: Gıda ve İlaç Derneği.
HD	: Hydrodistilasyon
LAF	: Laminar air flow
MDR	: multibiyotik direnç genleri
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyon
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP-2a	: penisilin bağlayıcı protein 2a
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XDR	: ilaca son derece dirençli
ZnO	: Çinko oksit

TABLÖLAR

Tablo 1: Bazı EY'ların kısa özeti.....	4
Tablo 2: EY'ların çeşitli biyoaktiviteleriyle ilgili yayınlar(PubMed search 14.05.2022)	7
Tablo 3: Standard suşlara karşı timol, karvakrol, perillil alkol ve eugenol MİK değerleri.....	22
Tablo 4: Timol, karvakrol, perillil alkol ve eugenolün klinik izolatlara karşı MİK değerleri.....	23

RESİMLER

Resim 1: <i>S. aureus</i> gram boyası.....	11
Resim 2: <i>E.coli</i> gram boyama mikroskopik görünümü	14
Resim 3: <i>E. coli</i> katı besiyerindeki koloni görünümleri	15
Resim 4 <i>P.aeruginosa</i> gram boyama mikroskopik görünümü.....	16
Resim 5: <i>K. pneumoniae</i> mikroskopik görünümü	17
Resim 6: <i>K. pneumoniae</i> McConkey Agar uremesi.....	18
Resim 7: <i>Enterococcus</i> gram boyama mikroskopik görünümü.....	19

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Timol, karvakrol ve eugenol çeşitli aromatik bitkilerin uçucu yağlarından ekstrakte edilen bileşikler olup, potansiyel antimikrobiyal ajan olarak kabul edilmişlerdir. Bu çalışmada; timol, eugenol ve karvakrol eklentili yeni oksipropanolamin bileşiklerinin antibakteriyel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM: Bu çalışmada test edilen standart suşlar ve klinik izolatlar (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*), Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alındı. Kimyasal ajanlar, Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden hazır olarak temin edildi. Hazırlanan dört bileşiğin (timol, eugenol, s-perillil alkol ve karvakrol eklentili oksipropanolamin bileşikleri) seçilen bakterilere karşı etkisi mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı.

BULGULAR: Standart suşlara karşı eugenol ve timol eklentili oksipropanolamin bileşiklerinin MİK değeri; *S. aureus* ve *E. faecalis* için 0.187 mg/ml, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* için 0.375 mg/ml iken s-perillil alkol eklentili bileşiğin MİK değeri tüm standart suşlarda 0.375 mg/ml saptandı. Karvakrolün *K. pneumoniae*, *S. aureus* ve *E. faecalis* için MİK değeri; 3,75 mg/ml ve *E. coli* ve *P. aeruginosa* için 15 mg/ml saptandı. Klinik izolatlara karşı test edilen dört bileşik *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı aynı MİK değerine (0.375 mg/ml) sahipti. S-perillil alkolün *S. aureus*'a karşı MİK değeri; 0.046-0.093 mg/ml iken *E. faecalis*'e karşı 1.07 mg/ml, karvakrolün *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı MİK değeri; 1.875 mg/ml, olarak saptandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ: Bu çalışmada timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenol eklentili oksipropanolamin bileşiklerinin hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. Yeni antibiyotikler geliştirilirken söz konusu ajanların bu özelliklerinden yararlanılabilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Antibiyotik, antibiyotik duyarlılık testi, MİK, eugenol, timol, karvakrol.

SUMMARY

Investigation Of The Antibacterial Effect of Thymol, Carvacrol, Perillyl Alcohol And Eugenol

INTRODUCTION AND AIM: Thymol, carvacrol and eugenol are compounds extracted from essential oils of various aromatic plants and have been accepted as potential antimicrobial agents. The aim of this study was to investigate the antibacterial effects of new oxypropanolamine compounds with thymol, eugenol and carvacrol added.

MATERIALS AND METHOD: The tested standard strains and clinical isolates (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*) were obtained from culture collections of Sakarya University Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory. Chemical agents (thymol, eugenol, s-perillil alcohol and carvacrol-added oxypropanolamine compounds) were obtained from Sakarya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry. The effects of the four compounds were investigated by microdilution method.

RESULTS: The MIC value of eugenol and thymol added oxypropanolamine compounds against standard strains was 0.187 mg/ml for *S. aureus* and *E. faecalis*, 0.375 mg/ml for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, the MIC value of s-perillil alcohol added compound was 0.375 mg/ml in all standard strains. MIC of carvacrol for *K. pneumoniae*, *S. aureus* and *E. faecalis*; 3.75 mg/ml and 15 mg/ml for *E. coli* and *P. aeruginosa*. In clinical isolates, the four compounds isolates had the same MIC (0.375 mg/ml) against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. MIC of S-perillil alcohol against *S. aureus* was 0.046-0.093 mg/ml and 1.07 mg/ml against *E. faecalis*, MIC value of carvacrol against *S. aureus* and *E. faecalis* was 1.875 mg/ml,

DISCUSSION AND CONCLUSION: In this study, it was determined that thymol, carvacrol, s-perillyl alcohol and eugenol-added oxypropanolamine compounds have

antibacterial activity against both gram-negative and gram-positive bacteria. These properties of these agents can be exploited when developing new antibiotics.

KEY WORDS: Antimicrobial, Antibiotic susceptibility tests, eugenol, carvacrol, thymol.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotik direnci dünyanın her yerinde önemli ölçüde artış göstermektedir. Yeni direnç mekanizmaları ortaya çıkmakta ve küresel olarak yayılmaktadır. Yeni direnç mekanizmaları yaygın bulaşıcı hastalıkları tedavi etme başarımızı tehdit etmektedir (<https://www.who.int/initiatives/glass> Erişim Tarihi: 5 Ağustos, 2021). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), bir dizi bakteriyi acil, ciddi ve ilgili tehditler olarak sınıflandırmıştır. Bunların çoğu hali hazırda ABD sağlık sistemi ve hastalar üzerinde önemli bir klinik ve mali yük oluşturmaktan sorumludur. CDC, en sık bildirilen dirençli bakteriler arasında *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* olduğunu bildirmiştir (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013> Erişim tarihi: 10 Nisan, 2013). Dirençli bakterilerin ortaya çıkması sonucu oluşan krizin yönetiminde yeni stratejiler uygulamak, araştırmaları yenilemek ve koordineli çalışmalara büyük ihtiyaç vardır. Bu çalışmalardan en önemlisi yeni antibiyotikler veya yeni antibiyotik kombinasyonları geliştirmeye çalışmaktır (Ventola CL, 2015; Gould IM et al., 2013; Spellberg and Gilbert, 2014).

Timol (2-izopropil-5-metilfenol, C₁₀H₁₄O) ve karvakrol (2-izopropil-5-metilfenol, C₁₀H₁₄O) temel olarak Lamiaceae, Lauraceae ve Myristicaceae gibi çeşitli aromatik bitkilerin uçucu yağlarından (esansiyel yağlar-EYs) elde edilen biyoaktif izomerik monoterpenoid bileşenlerdir (Burt, 2004; Amiri, 2012). Eugenol de (C₁₀H₁₂O₂; fenilpropanoid), fenoller grubuna ait aromatik bir bileşiktir. Genellikle bitkilerden elde edilen doğal uçucu yağlardan elde edilir. Lamiaceae, Lauraceae ve Myristicaceae aileleri; bakterilere, mantarlara, virüslere ve hatta parazitlere karşı etkili antimikrobiyal maddeler içermekle birlikte, antioksidan, antikanser ve bilişsel güçlendirici aktivitelere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Tohidpour et al., 2010; Azizi et al., 2012; Braga, 2005; Ulanowska and Olas, 2021). Karvakrol ve timol genellikle insanlar için güvenli olarak kabul edilir (Ogaard et al., 1997; Khan et al., 2017; Kachur and Suntres, 2020). Dikkat çekici bir şekilde, bu bileşikler FDA ve EPA tarafından Genel Olarak Güvenli (GRAS) olarak tanınır ve yaklaşık 1 g/kg

LD50'ye sahiptir, bu da formülasyonlarının insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkilerden yoksun olmasını sağlar (Youssefi et al., 2019). S perillil akol()([4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl]metanol), doğal olarak oluşan monosiklik terpenlerdir. Lavanta, limon otu, adaçayı ve nane gibi çeşitli bitkilerin uçucu yağlarında bulunabilir. Limonen ve perillil alkolün yanı sıra bunların metabolitleri (özellikle perillik asit ve metil esteri), antitümör, antiviral, antienflamatuar ve antibakteriyel ajanlar gibi biyoaktivitelere sahiptir (Muhtar et al., 2018).

EY'lar, birçok doğal kaynaktan elde edilebilmeleri ve düşük toksisiteleri nedeniyle bakterilere karşı yeni tedavilerin geliştirilmesi için önemli başlangıç noktaları olarak kabul edilebilir. EY'ların hidrofobik özelliği, EY'ların etki mekanizmalarını anlamak açısından en önemli özellik olarak kabul edilmektedir. Bu bileşikler, bakterilerin hücre zarı lipidlerinden geçerek membran yapısının daha geçirgen hale gelmesine, hücre zarını parçalanmasına, enzim sistemlerinin bloke edilmesine veya iyon kanallarının bozulmasına neden olurlar (Sikkema et al., 1994). Hücre zarı geçirgenliğinin bu tür bir hasarı, bakteri hücreleri için genellikle öldürücüdür (apoptosis) (Carson et al., 1995; Cox S.D et al., 2000). pH değişimi ve proton hareket kuvvetinin elektrik potansiyeli, membran yapısını bozabilecek diğer mekanizmalardır (Lambert et al., 2000). Timol, karvakrol gibi yüksek fenolik bileşiklere sahip EY'ların daha güçlü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Guynot,2003).

Bu çalışmanın amacı, timol, eugenol ve karvakrol eklentili yeni oksipropanolamin bileşiklerinin standart suş ve klinik izolatlardan *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisini değerlendirmektir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ESANSİYEL YAĞLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Esansiyel yağlar; uçucu yağlar, eterik yağlar, aetheroleum veya sadece karanfil yağı gibi özütlendikleri bitkinin yağı olarak da bilinir. Fransız Normalleştirme Ajansı: Agence Française de Normalization (AFNOR) bunu şu şekilde tanımlamaktadır (NF T 75-006): "Uçucu yağ, bitkisel bir ham maddeden ya buharla damıtma yoluyla ya da epikarptan kuru damıtma mekanik işlemlerle elde edilen üründür." Uçucu yağ daha sonra fiziksel yollarla sulu fazdan ayrılır. Uçucu yağlar alkolde, sabit yağlar ve eterlerde çözünür, ancak suda çözünmez. Bu yağlar genellikle sıvı ve renksizdir. oda sıcaklığında, ısıya, neme ve oksijene karşı oldukça hassastır. Karakteristik bir kokuya sahiptirler, oda sıcaklığında genellikle sıvıdırlar ve birkaç durum dışında (tarçın ve sassafras) birden az yoğunluğa sahiptirler. Bu uçucu yağların içerdiği uçucu yağlar bitkilerin yaydığı farklı kokulardan sorumludur (Dhifi et al., 2016).

Bilindiği gibi, bitki EY'larının kimyasal bileşimi esas olarak mono- ve seskiterpen hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri ile temsil edilir. EY'lar, aşağıdakiler bitkilerin farklı kısımlarından elde edilebilir:

- Çiçekler: portakal, lavanta ve karanfil çiçeği
- Yapraklar: okaliptüs, nane, kekik, defne yaprağı, tuzlu, adaçayı, çam iğneleri ve ağaç yeraltı organları, örneğin kökler (güveotu),
- Rizomlar: zencefil, tatlı bayrak
- Tohumlar: kimyon, kişniş
- Meyveler: rezene, anason, narenciye epikarpları
- Odun ve ağaç kabukları: tarçın, sandal ağacı, gül ağacı (Surburg, 2016).

EY'lar kimyasal yapılarına göre dört farklı gruba ayrılır: terpenler, terpenoidler, fenilpropenler ve diğerleri (Hyldgaard et al., 2012). Aynı türden bitkilerden elde edilen EY'ların bileşimi, coğrafi konumlara ve EY'ların çıkarıldığı bitkinin

olgunluğuna göre farklılık gösterir (Benabdelkader et al., 2011). EY'lar ikincil metabolitler olarak kabul edilir ve antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları için bitki savunmasında önemlidir (Tajkarimi et al., 2010).

 u ana kadar yaklaşık 3000 EY bilinmektedir. Tablo 1'de bunlardan bazıları aktif metabolitleri ile özetlemektedir.

Table 1: Bazı EYların kısa  zeti

Aktif Madde	Yaygın İsim	Bitki
Timol	Kekik	Timus Vulgaris
Karvakrol	Kekik	Origanum vulgare
Izotiyosiyanat	Sarımsak	Allium sativum
linalool, mirsen, kafur	limon balsamı	Melisa officinalis
Sinnamaldehit	Tarçın	tarçın zelansiyum
Linalol, linalil asetat	Lavanta	Lavandula angustifolia

2.2.Esansiyel Yağların Sınıflandırılması

2.2.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

- Terpenler,
- Terpenoidler
- Fenilpropenler
- Diğerleri (Hyldgaard et al.,2012).

2.2.2. Biyolojik Aktivitelerine Göre Sınıflandırılması

Antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparazit, kepek önleyici, spazmodik, antioksidan, antitumor, kemoprotektif, allelopatik, sitotoksikite ve insektisidal aktiviteye sahip birçok EY vardır (Dhifi et al., 2016; Ali et al., 2015).

2.2.3. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

EY'lar, koku özelliklerine göre de sınıflandırılabilir. Yağ içindeki en baskın aromatik özelliğe göre 18 aromatik gruba ayrılmış 100'den fazla uçucu yağ bulunmaktadır.

2.3. ESANSİYEL YAĞLARIN ELDE EDİLME YÖNTEMLERİ

EY'ların bitkilerden elde edilmesinde için iki temel teknik kullanılmaktadır: azEYtropik damıtma (hidrodistilasyon, hidrodifüzyon ve buhar damıtma) ve solventlerle ekstraksiyon (Alyemni et al., 2019). Bu yöntemler dışında mekanik yöntem ve solventsiz mikrodalga yöntemleri de bulunmaktadır. Bu yöntemler içersinde buhar damıtma yöntemi, ticari ölçekli üretim açısından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Cassel and Vargas, 2006).

2.3.1. Damıtma

2.3.1.1. Buhar Damıtma

Buhar damıtma, bitkisel yağ ekstraksiyonunda diğer tüm yöntemler arasında en popüler yöntem olarak kabul edilir (Reverchon ve Senatore, 1992). Bu teknikte buharla ısıtılan kaynamış suya bitki materyali eklenir. Bitki materyalinin hücre yapısının patlamasına ve parçalanmasına neden olacak kadar yüksek olması gereken ısı, daha sonra EY buharlaştırılır, bu sayede bir yoğunlaştırıcıdan geçer ve ardından yağı sudan ayırmak için bir ayırıcıya geçer (Babu and Caul, 2005).

2.3.1.2. Hidrodestilasyon

Daha yaygın olarak kullanılmaya başlanan HD, ahşap veya çiçek gibi bitki materyallerinden yüksek kaynama noktasına sahip suda çözünmeyen doğal ürünleri elde etmenin standart yolu olarak kabul edilmektedir. İşlem, bitki materyallerinin

suya yerleştirilmesini ve ardından kaynatılmasını içerir. Bu yöntemde, esansiyel yağları çevreleyen su, aşırı ısınmayı önlemek için bir bariyer görevi gördüğünden, elde edilen yağları belirli bir dereceye kadar korur. Daha sonra, uçucu yağ buharı, sulu bir fraksiyona yoğunlaştırılır (Tongnuanchan ve Benjakul,2014).

2.3.2. Solvent Ekstraksiyonu

2.3.2.1. Çözücü

Buhar damıtma ısısına tolerans göstermeyen kırılgan veya narin çiçek malzemeleri için geleneksel solvent ekstraksiyonu uygulanmaktadır. Ekstraksiyon için aseton, heksan, petrol eteri, metanol veya etanol gibi farklı çözücüler kullanılabilir (Kosar et al., 2005). Temel olarak, bitki materyali bir çözücü ile karıştırılır ve ardından süzülür. Daha sonra, süzüntü, çözücü buharlaşmasıyla konsantre edilir. Bu işlem daha zahmetli, zaman alıcı ve nispeten pahalıdır (Li et al., 2009).

2.3.2.2. Süperkritik Karbon Dioksit

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin dezavantajları nedeniyle, alternatif bir yöntem olarak süper kritik akışkanlar geliştirilmiştir. Karbondioksit (CO₂), daha az risk nedeniyle en yaygın kullanılan süper kritik akışkandır (Senorans et al., 2000).

2.3.3. Solventsiz Mikrodalga

Çözücü veya hidrodifüzyon ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemlerin, bazı uçucu bileşiklerin kayıpları, düşük ekstraksiyon verimi, uzun ekstraksiyon süresi, doymamış veya ester bileşiklerinin termal veya hidrolitik etkilerle bozunması ve ekstrakttaki toksik solvent kalıntısının gelişmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Luque de Castro et al., 1999). Bu nedenle, herhangi bir su veya çözücü kullanılmadan mikrodalga ısıtma ve kuru damıtma kombine edilmesi ile solventsiz mikrodalga yöntemi geliştirilmiştir (Tongnuanchan ve Benjakul,2014).

2.3.4. Mekanik Yöntem (Presleme)

Soğuk presleme yöntemi esas olarak bitki, çiçek, tohum, limon, mandalina yağlarından esansiyel yağların elde edilmesi için kullanılır. Bu işlemde bitkilerin dış tabakasında bulunan yağlar fırçalanarak uzaklaştırılır. Daha sonra tüm bitki preslenerek yağın açığa çıkması sağlanır. Daha sonra santrifüj edilerek üst kısımda kalan yağ alınır (Arnould et al., 1981).

2.4. ESANSİYEL YAĞLARIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

PubMed veri tabanında yakın zamanda yapılan bir araştırmaya dayanarak EY'ların tüm biyolojik aktiviteleri arasında antimikrobiyal aktivitenin en çok çalışılan aktivite olduğu görülmektedir (Tablo 2). Bu, uçucu yağların çeşitli biyoaktiviteleri arasında antimikrobiyal potansiyelin önemini ifade eder.

Table 2: EYların çeşitli biyoaktivitelerile ilgili yayınlar(PubMed search 14.05.2022)

Biyolojik Aktivite	Yayın Sayısı
Antimikrobiyal	13765
Antioksidan	3983
Antienflamatuvar	1697
Analjezik	855
Antikanser	508
Yatıştırıcı	201
Spazmolitik	141
Yara İyileşmesi	181
İmmünomodülatör	119
Anti Alerjik	47

Mide Koruyucu	65
Antiaging	21
Antidepresif	127

EY'ların kimyasal yapısının çeşitliliği, bileşiklerinin niteliksel ve niceliksel farklılıkları ve çeşitli bitki yetiştirme ve toplama koşulları gibi faktörler bileşiklerin etki mekanizmasına katkı sağlamaktadır. Gram pozitif bakterilerin, dış zarlarının varlığı ve karmaşıklığı nedeniyle EY'lara karşı Gram negatif bakterilere göre daha savunmasız olduğu bildirilmiştir. Gram negatif bakterilerin dış zarındaki lipopolisakkaritin hidrofobik özelliklerinin EY'ların difüzyonunu sınırladığı bilinmektedir (Burt, 2004; Chorianopoulos, 2004).

EY'ların hidrofobikliği, EY'ların etki mekanizmalarını anlamak açısından en önemli özellik olarak kabul edilir. Bakterilerin hücre zarının lipidlerinden geçerek yapıyı bozarak daha geçirgen hale getirmelerini sağlar, hücre zarını parçalayabilir, enzim sistemlerini bloke edebilir veya iyonun bozulmasına neden olabilir (Sikkema et al., 1994). Hücre zarı geçirgenliğinin bu tür bir hasarı, bakteri hücreleri için genellikle öldürücüdür (Apoptosis) (Carson et al., 1995; Cox S.D et al., 2000). Muhtemelen membran arızasına neden olabilecek diğer mekanizmalar, pH değişim ve proton hareket kuvvetinin elektrik potansiyelini içerir (Lambert et al., 2000). Timol ve karvakrol gibi yüksek fonlik bileşiklere sahip EY'ların daha güçlü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Guynot, 2003).

2.5. TİMOL, KARVAKROL, EUGENOL VE S-PERİLLİL ALKOL

Timol (2-izopropil-5-metilfenol) ve karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) izomerleri doğal olarak bulunan bir fenol monoterpen türevidir. Her ikisi kekik gibi Lamiaceae ve Verbenaceae familyalarının çeşitli bitki türlerinden elde edilen uçucu yağların ana bileşenleridir. Bu bitkiler yaygın olarak bazı yemekleri katılan baharatlar arasında bulunmaktadır. Ayrıca, farklı tıbbi amaçlar için uzun bir kullanım geçmişine sahiptir

(salehi et al., 2018; Bej et al., 2020). Oral uygulamadan sonra timol hızla emilir ve yaklaşık 24 saat içinde yavaşça elimine edilir. Plazmada timol sülfat formunda bulunur ve idrarda iki faz II konjugatı (timol sülfat ve timol glukuronid) olarak bulunabilir. Glukuronid oluşumu sadece daha yüksek dozlarda gözlenmiştir (Kowalczyk, et al., 2020). Timol ve karvakrol'ün bakteriler (metisiline dirençli *S. aureus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus carvatus* ve *Lactobacillus sake*) mantarlar (*Aspergillus spp.* ve *Candida spp.*) ve parazitler (*Blastocystis* ve *Endolimax nana*) üzerinde geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu öne sürülmüştür (Yamazaki et al., 2001; Sakkas and Papadopoulou, 2017; Smith-Palmer, 1998; Sagdec, 2003; Giordani et al., 2004; Pina-Vaz et al., 2004; Tohidi et al., 2020). Timolün antibakteriyel aktivitesinin mekanizmasının araştırıldığı çalışmalar, hücre zarının lipid tabakasına entegre olabileceğini ve yüzey gerilimini değiştirdiğini düşündürmüştür. Molekülün hidrofilik kısmı, zarın polar kısmı ile etkileşime girerken, hidrofobik benzen halkası ve alifatik yan zincirler biyolojik zarın iç kısmına batar. Membran yapısındaki bu büyük değişiklik, lipid tabakasının kararsızlaşmasına, elastikiyetinin azalmasına ve akışkanlığın ve membran geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bu süreçte enzimler ve reseptörler gibi iç zar proteinlerinin aktivitesi de etkilenir. Timol, hücre zarına entegre olduktan sonra gömülü proteinler ile çeşitli spesifik olmayan mekanizmalar yoluyla etkileşime girer, bu da iç ve dış zar proteinlerinin konformasyonunda ve aktivitesinde değişikliklere yol açar. Bu nedenle, hücre zarı gerilimi ve kararsızlığı, timolün varlığı ile indüklenebilir. Karvakrol, bakteri zarı üzerinde timole benzer şekilde etki eder (Nazarl et al., 2019; Kowalczyk et al., 2020).

Eugenol (EUG) (C₁₀H₁₂O₂; fenilpropanoid), fenoller grubuna ait aromatik bir bileşiktir. Yaygın olarak Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae ve Myristicaceae ailesinden bitkilerin doğal uçucu yağlarından elde edilir ve karanfil yağının (*Syzygium aromaticum*) en önemli bileşenidir. Eugenol'ün *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi birçok türe karşı antibakteriyel

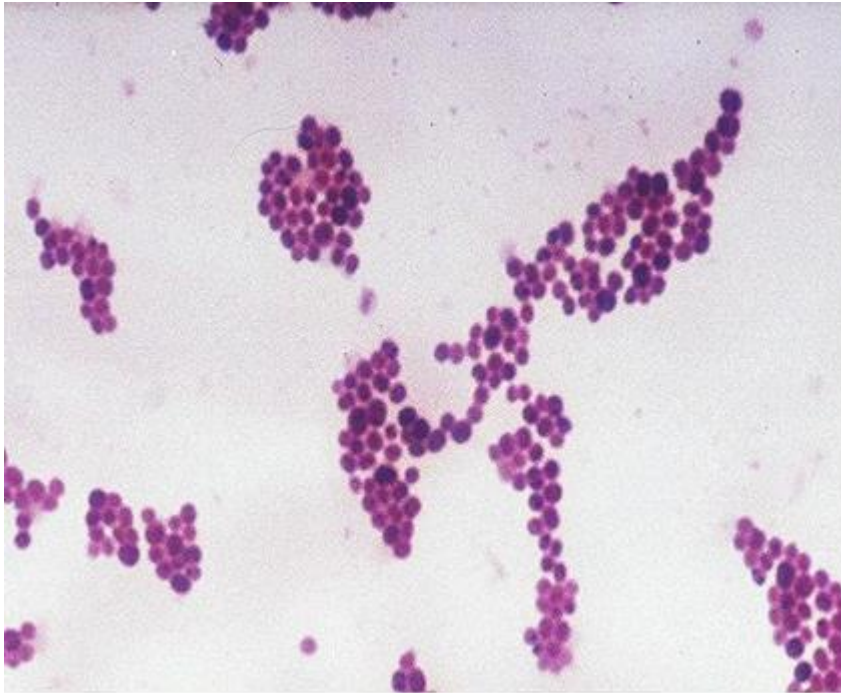
özelliklere sahip olduğu bildirmiştir (Ulanowska ve Olas, 2021). Eugenolün gram negatif bakterilere karşı, sitoplazmik membrana zarar vererek etki ettiği düşünülmektedir. Hidrofobik bir molekül olması, eugenolün *Salmonella typhi*'ye karşı antibakteriyel aktivitesinde bildirildiği gibi lipopolisakkarit hücre zarına kolayca nüfuz edebildiği ve sitoplazmaya girebildiği rapor edilmiştir (Ulanowska ve Olas, 2021). Eugenol, ayrıca sinirsel korumada büyük rol oynar, cilt geçirgenliğini artırır, ağrıları giderir, geçici diş dolgusu oluşumunda (ZnO+EUG) rol oynar. EUG'nin daha küçük miktarlarda bilinen bir toksisitesi yoktur, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi davranır; dolayısıyla bu molekül tarafından güçlü bir antikanser aktivite gösterilmektedir (Nisar et al., 2021).

Perilil alkol (POH)([4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl]metanol) ve öncüsü limonen, mevalonat yolundan türetilen doğal olarak oluşan monosiklik terpenlerdir. Perilil alkol, lavanta, limon otu, adaçayı ve nane gibi çeşitli bitkilerin uçucu yağlarında bulunabilir. Monosiklik monoterpenler, sayısız hastalığı tedavi etme yeteneklerinden dolayı faydalı farmakolojik bileşenler olarak kabul edilmiştir. Limonen ve perilil alkolün yanı sıra bunların metabolitleri (özellikle perilik asit ve metil esteri), antitümör, antiviral, antienflamatuar ve antibakteriyel ajanlar gibi biyoaktivitelere sahiptir. Bu terapötik özellikler iyi belgelenmiştir. Antikanser olarak rolü, antibakteriyel rolünden daha belirgindir (Muhtar et al., 2018). D'Alessio et al.(2014) tarafından yapılan bir çalışmada, POH'nin muhtemelen proinflamatuar sitokinler IL-6 ve TNF'yi azaltarak yara iyileşmesini desteklediğini bildirmiştir. Antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı çalışmalarda POH'nin *P. gingivalis* ve *F. nükleatum*'a karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, 100 uM'ye kadar POH'ın murin makrofajları için sitotoksik olmadığı ancak hücre proliferasyonu, LPS ile indüklenen ROS üretimini ve IL-4 ile indüklenen Arginaz-1 ekspresyonunu azalttığı belirtirmiştir (Figueiredo et al., 2020).

2.6. MİKROORGANİZMALAR

Her geçen yıl, mikroorganizmalar ve insan sağlığı arasındaki önemli ilişkiler hakkında yeni bilgiler ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizma topluluğu beş biyolojik gruba ayrılabilir: algler, protozoalar, mantarlar, bakteriler, arkeler ve virüsler. Hücresel yapılarına göre ökaryotik ve prokaryotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Pitt and Barer, 2012). İnsanlar ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşime göre iki gruba ayrılmaktadır: insan vücuduna zararlı mikroorganizmalar ve zararsız ya da faydalı mikroorganizmalar. İnsana zarar verebilen mikroorganizmalara patojen adı verilirken, diğeryandan başka bir canlı organizma (insan veya hayvan) veya cansız bir nesne üzerinde hastalığa neden olmadan yaşayan mikroorganizmalar da bulunmaktadır. İnsan vücuduna zararsız ya da faydalı mikroorganizmalara flora, mikrobiyota ya da mikrobiyom denmektedir (Crutis and Serpandio, 2011). Ancak patojen olmayan bir mikroorganizma immun yetemezlik ya da disbiyosis gibi çeşitli durumlarda patojen özellik gösterebilir (Erberl, 2010).

2.6.1. *Staphylococcus aureus*

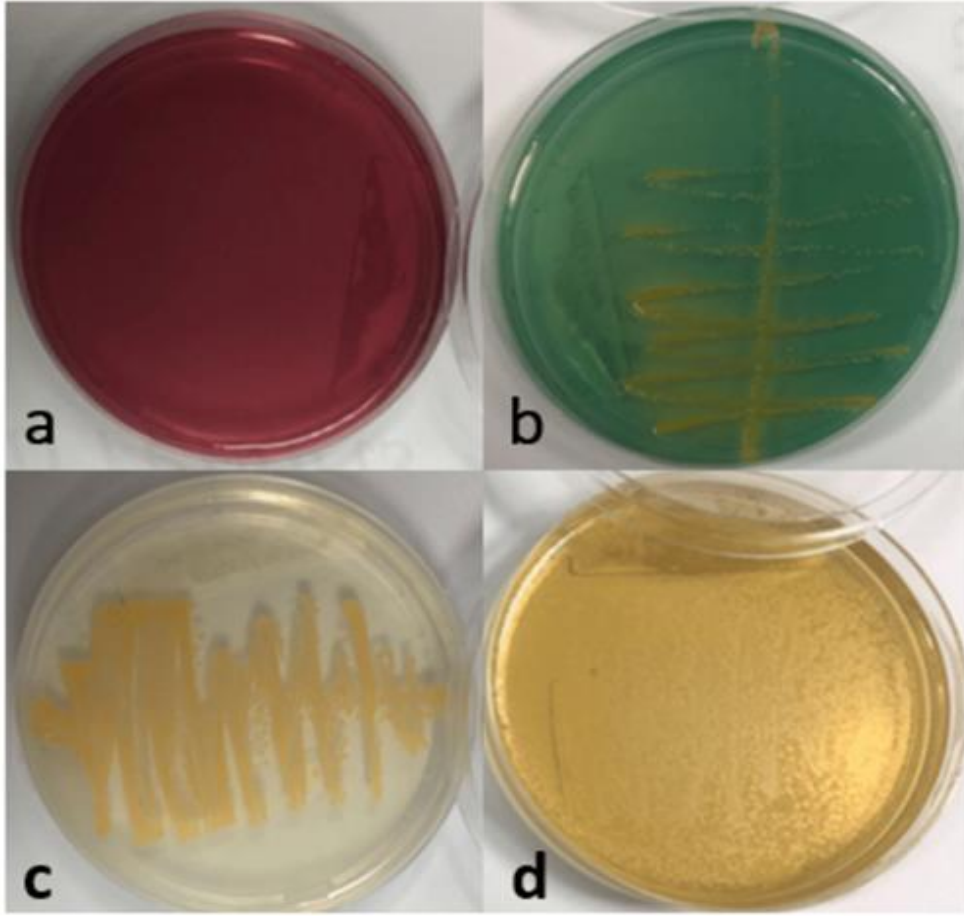


Resim 1: *S. aureus* gram boyama mikroskopik görünümü

(https://www.researchgate.net/figure/Gram-stain-of-Saureus_fig4_290911856)

Erişim Tarihi: 02.01.2015)

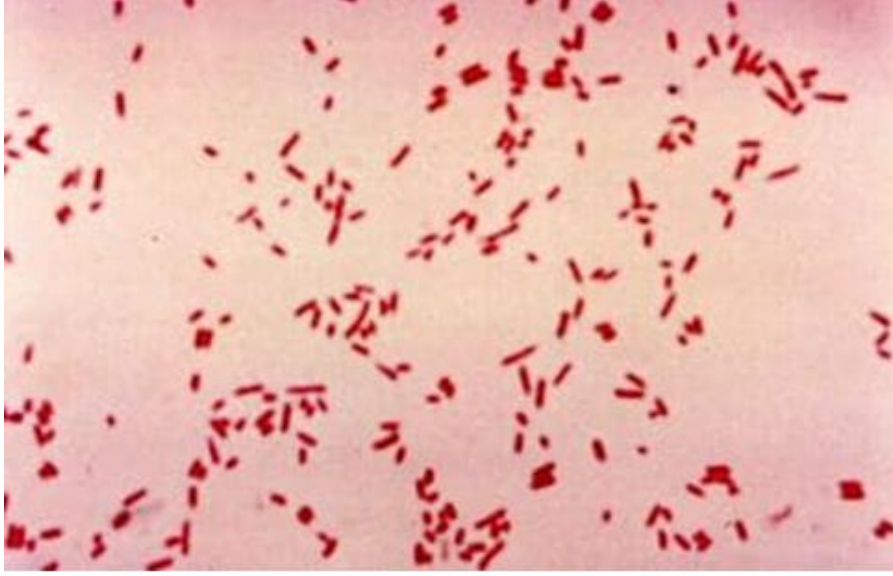
S. aureus, hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir insan patojeni olarak kabul edilir. Üzüm benzeri, kok şeklinde olan ve kümeler halinde düzenlenme eğilimi gösteren, spor oluşturmayan, hareketsiz, deride ve mukozalarda yerleşik normal flora üyesi Gram pozitif bakterilerdir. Genellikle sağlıklı bireylerin burun bölgesinde olmak üzere flora da ve çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Çevresel ortamda, %10'a kadar tuzlu suda çoğalamaktadır. Bu organizmalar fakültatif anaerobiktir ve 18-40 °C arasındaki sıcaklıklarda büyürler. Kültürde üretildiklerinde kolonileri genellikle altın sarısı rengindedir. *Staphylococcus* türlerini birbirinden ayırt etmek için katalaz pozitif (tüm patojenik *Staphylococcus* türleri), koagülaz pozitif (*Staphylococcus aureus*'u diğer *Staphylococcus* türlerinden ayırt etmek için), novobiyosin duyarlılığı (*Staphylococcus saprophyticus*'tan ayırt etmek için) ve mannitol fermentasyonu (*Staphylococcus epidermidis*'ten ayırt etmek için) gibi biyokimyasal testler kullanılmaktadır (Rasigade and Vandenesch, 2014). *S. aureus* insanlarda en yaygın patojenlerden biri olarak kabul edilir ve bakteriyemi, gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu, idrar yolu enfeksiyonları, enfektif endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (örn., impetigo, folikülit, fronküller, karbonküller, selülit, haşlanmış deri sendromu ve diğerleri), osteomyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları ve akciğer enfeksiyonları (örn., pnömoni ve ampiyem) gibi birçok enfeksiyonlara neden olur. İletim doğrudan temas yoluyla gerçekleşir. Son yirmi yılda metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları olarak adlandırılan dikkat çeken bir suş ortaya çıkmıştır (Otto, 2013), mec tipine bağlı olarak çoklu antibiyotiğe direnç kazandıran bakteri kromozomu üzerinde bir mec geni taşır. mec geni, PBP-2a'yı (penisilin bağlayıcı protein 2a) kodlar. PBP-2a, penisilin bağlayıcı bir proteindir (PBP) veya bakteri hücre duvarında peptidoglikan üretimini katalize eden temel bakteri hücre duvarı enzimidir. Bu patojenin patofizyolojisi, toksin üretimi ve doku invazyonu ile olabilen enfeksiyon tipine ve enfekte eden *S.aureus* suşuna bağlıdır.(Tayler and Uncal, 2020; Tong et al., 2015).



Resim 2: *Staphylococcus aureus* katı besiyerindeki koloni görünümüleri (a) MacConkey Agar Üremesi (b) CLED Agar Üremesi (c) Nutrient Agar Üremesi (d) Bile esculin Üremesi

(https://www.researchgate.net/figure/Figure-13-The-culturing-of-Staphylococcus-aureus-on-a-MacConkey-agar-media-b-CLED_fig4_339662781 Erişim Tarihi: 01.01.2020)

2.6.2. *Escherichia coli*



Resim 2: E.coli gram boyama mikroskopik görünümü

(https://www.researchgate.net/figure/Gram-negative-pink-colored-small-rod-shape-E-coli-under-light-Mikroscope-100x_fig3_316210773 Erişim Tarihi: 01.12.2016)

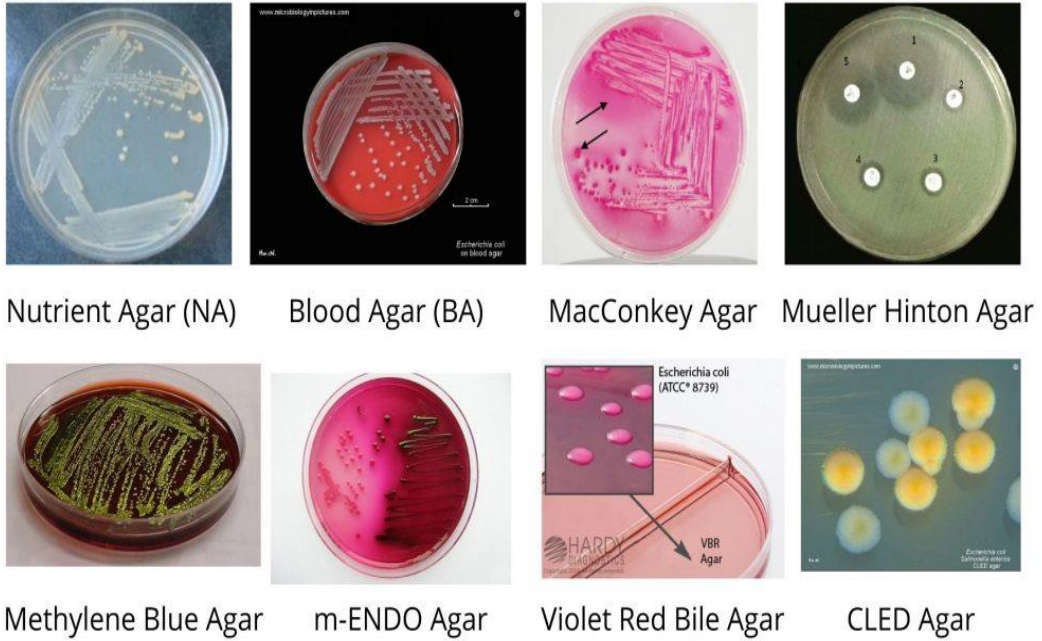
E. coli, Gram negative, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, koliform bakterilerdir. Aerobik koşullar altında 37°C'de genel veya seçici besiyerinde klinik örneklerden kolayca elde edilir. Feko-Oral yol ile bulaşır. Dışkıdaki *E. coli* en sık olarak, Enterobacterales üyelerini seçici olarak büyüten ve morfoloji temelinde enterik organizmaların ayırt edilmesine izin veren MacConkey veya EMB agarda üretilir (Balows et al., 1991).

Bağırsak normal florasının bir üyesi olduğu ve bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık %0,1'ini oluşturduğu bilinmektedir (Eckburg et al., 2005), ancak insanlarda çeşitli bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklara neden olabilir (Mueller and Tainter, 2022).

Patojenik *E. coli* suşları genel olarak üç temel klinik sendrom ile ilişkili bulunmuştur: (i) idrar yolu enfeksiyonu, (ii) sepsis/menenjit ve (iii) enterik/ishal hastalığı *E. coli*'nin ishalli suşları, patojenik özelliklere bağlı olarak en az altı farklı kategoriye ayrılabilir. Birlikte ele alındığında, bu organizmalar muhtemelen dünya çapında pediatrik ishalin en yaygın nedenini temsil etmektedir. Yolcu ishali (enterotoksijenik *E. coli*), hemorajik kolit ve hemolitik-üremik sendrom (enterohemorajik *E. coli*), kalıcı diyare (enteroagregatif *E. coli*) ve sulu ishal

bebekler (enteropatojenik *E. coli*). dahil olmak üzere enfeksiyona birkaç farklı klinik sendrom eşlik eder (Nataro et al., 1998).

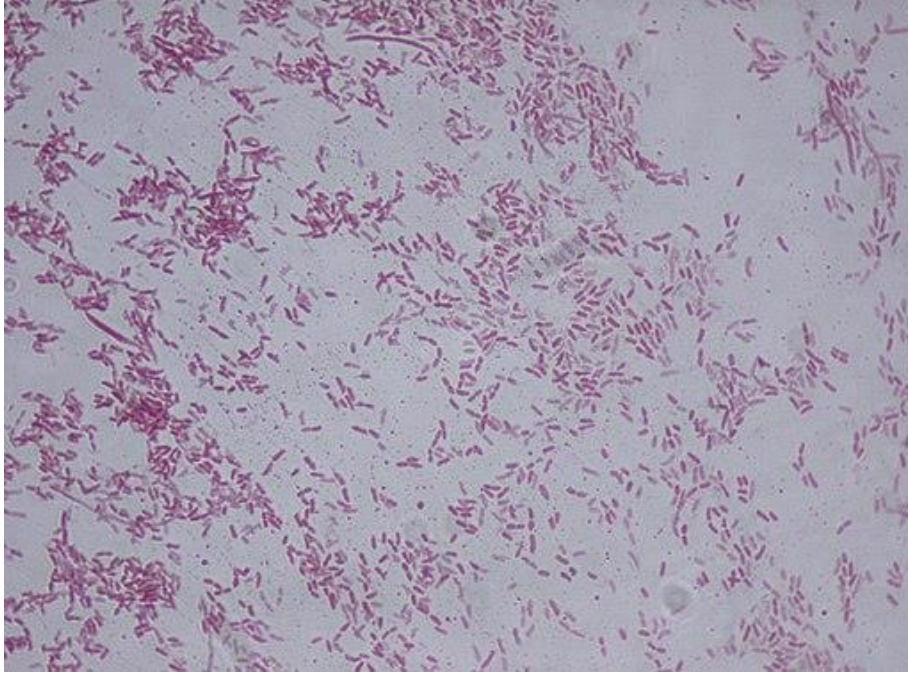
E. coli birçok yolla sınıflandırılabilir: biyokimyasal, serotipik (O (somatik), H (flagellar) ve K (kapsüler, fenotipik olarak)(Nataro et al., 1995).



Resim 3: *E. coli* katı besiyerindeki koloni görünüşleri
(<https://microbiologynote.com/escherichia-colie-coli-morphology-arrangement-cultural-characteristics-diagnosis/> Erişim Tarihi: 26.09.2021)

2.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

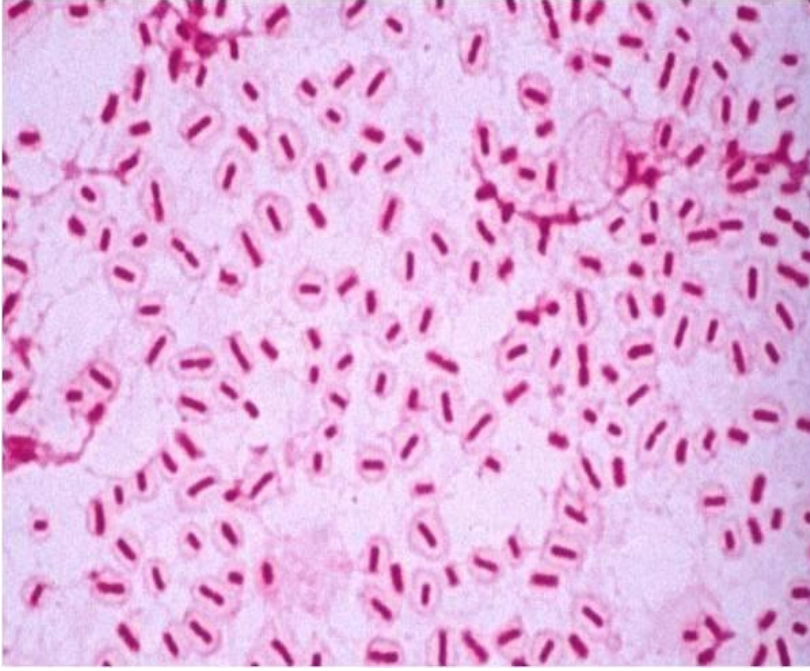
Pseudomonas aeruginosa, özellikle yanık yaraları, kronik yaralar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı başta olmak üzere hem bağışıklığı yeterli hem de bağışıklığı baskılanmış konaklarda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen gram-negatif, aerobik, kapsüllü, spor oluşturmeyen bir çubuktur (Mulcahy et al., 2014; Kerr and Snelling, 2009).



Resim 4: P.aeruginosa gram boyama mikroskopik görünümü
(<https://www.microscopemaster.com/pseudomonas.html> Erişim Tarihi:
03.05.2014)

Sitrat, katalaz ve oksidaz pozitifdir, cilt florasında ve özellikle tatlı su ortamında bulunabilir. Fırsatçı patojen olarak sınıflandırıldığı düşünülür ve çoklu ilaç direnci ve geniş kapsamlı dinamik savunma geliştirme yeteneğine sahiptir. Tüm bu faktörler, yönetimini zorlaştırmıştır (Wilson ve Pandey, 2022). Folikülit, osteomyelitte yol açan delinme yaraları, pnömoni, otitis eksterna, kistik fibrozis alevlenmeleri, yanık enfeksiyonu ve ventilatöre bağlı pnömoni, kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonları, endoftalmi, endokardit, menenjit gibi birden fazla hastane kaynaklı enfeksiyona neden olur. *P. aeruginosa'nın* (A) dış zar geçirgenliğinden elde edilen içsel antibiyotik direnci, antibiyotikleri hücre dışına pompalayan akış sistemleri ve β - gibi antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretimi dahil olmak üzere çok çeşitli virülans faktörlerine sahip olduğu iyi bilinmektedir. laktamazlar, (B) mutasyon ve direnç genlerinin kazanılmasından kaynaklanan kazanılmış direnç ve (C) Biyofilm gibi adaptif antibiyotik direnci.(Pang et al., 2019).

2.6.4. *Klebsiella pneumoniae*



Resim 5: *K. pneumoniae* mikroskopik görünümü
(<https://medicoapps.org/tag/k-pneumoniae/> Erişim Tarihi: 20.11.2011)

K. pneumoniae geniş hastalık spektrumuna neden olan ve antibiyotiklere karşı giderek daha sık direnç kazanan fırsatçı patojenlerden biri olarak kabul edilen önemli bir Enterobacterales'dir. Gram negatif, hareketsiz, kapsüllü, laktozu fermente eden, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. MacConkey agar üzerinde mukoid laktoz fermenter olarak görünür, çevrede bulunur ve alkol kullanım bozukluğu veya diyabeti olan hasta popülasyonlarında pnömoni ile ilişkilendirilmiştir (Effah et al., 2020). Dikkate değer, *K. pneumoniae*, gastrointestinal (GI) yol ve kolonizasyonunun etkilerinin iyi huylu görüldüğü nazofarenkste birkaçı dahil olmak üzere insan mukozal yüzeylerini kolayca kolonize eder (Paczosa et al., 2016). Bu organizmanın idrar yolu enfeksiyonları, sistit, pnömoni, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit, septisemi, nekrotizan pnömoni, piyojenik karaciğer apseleri ve endojen endoftalmi gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (Navon-Venezia et al., 2017). Bugün, *K. pneumoniae* pnömonisi Amerika Birleşik Devletleri'nde hastane kökenli pnömoninin en yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir (Jondle et al., 2018).

Virölansı ile ilgili olarak, kompleks asidik polisakkaritlerden oluşan kapsülün, bakterileri fagositoz ve serum bakterisidal proteinler, lipopolisakkarit, fimbria ve sideroforlardan koruyan önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer birkaç faktör daha az iyi karakterize edilmiştir, ancak en az bir enfeksiyon modelinde de önemlidir. Bununla birlikte, *K. pneumoniae* suşlarında önemli miktarda heterojenlik vardır, yani farklı suşlar boyunca her virulent faktörün öneminde bir varyasyon bulmak mümkündür (Paczosa et al., 2016). CDC'ye göre *Klebsiella* bakterileri, son zamanlarda karbapenemler olarak bilinen antibiyotik sınıfına karşı artan antimikrobiyal direnç geliştirmiştir. Birçok aksesuar plazmit genomu ve kromozom gen lokuslarına sahiptir. Aksesuar genomu göre, *K. pneumoniae* suşları üç tipe ayrılır: fırsatçı, hipervirulent ve çoklu ilaca dirençli (MDR) (Martin ve Bachman, 2018). MDR *K. pneumoniae*, plazmit tarafından kodlanan antibiyotik direnç genleriyle (ARG'ler) yakın ilişki ile karakterize edilir. *K. pneumoniae*, uygunsuz antibiyotik kullanımı bağlamında ARG'leri biriktirmeye devam ederek, "süper resistome" ile aşırı derecede ilaca dirençli (XDR) bir suşun ortaya çıkmasına neden olur (Wanget al., 2020).

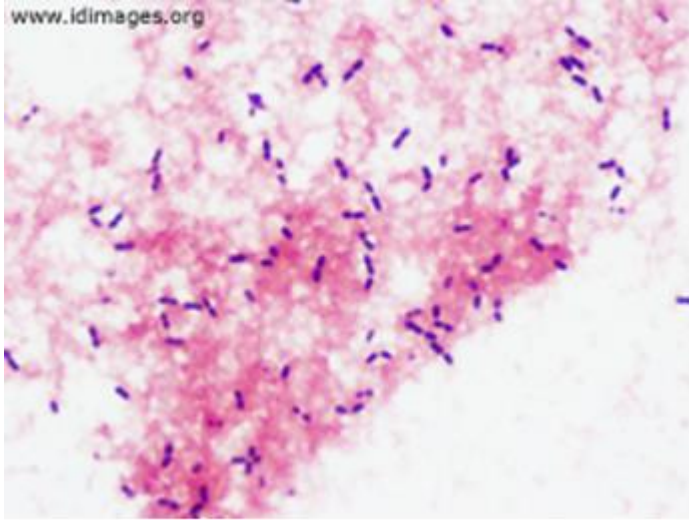


Resim 6: *K. pneumoniae* McConkey Agar ı Agar Üremesi.

https://www.researchgate.net/publication/331651018_Klebsiella_pneumoniae_growth_on_macconkey_agar_medium Erişim Tarihi: 30.05.2007)

2.6.5. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis Gram pozitif, oval şekilli. ve yaymada kısa zincirler, çiftler veya tek hücreli, hareketsiz, spor oluşturmeyan, glukoz fermenter, fakültatif anaerob bakterilerdir (Gilmore et al.,2013). İnsanların mide-bağırsak yollarının ortak mikrobiyotasının çekirdek üyeleridir (Lawly ve Walker, 2013).



Resim 7: Eenterococcus gram boyama mikroskopik görünümü

(<https://www.idimages.org/atlas/organism/?atlasentryID=80&organism=Enterococcus>

Erişim Tarihi: 01.04.2008)

Enterokoklar katalaz negatiftir, aşırı alkali pH (9.6) ve tuz konsantrasyonları dahil olmak üzere çok zorlu ortamlarda hayatta kalır. Safra tuzlarına, deterjanlara, ağır metaller, etanol, azide ve kurumaya karşı dirençlidirler. Fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir (Murry, 1990). Endokardit, sepsis, cerrahi yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve diğerleri gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (Makki ve Agar, 1988). *E.faecalis* genellikle yaygın olarak kullanılan birçok antimikrobiyal ajana (aminoglikozidler, aztrEYnam ve kinolonlar) karşı dirençlidir. Direnç, kromozom veya plazmitte ilaç direnci ile ilgili çoklu genlerin varlığından kaynaklanmaktadır (Panthee et al.,2021).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. BAKTERİYEL KÜLTÜRLER

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan standart suşlar (*S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pnömoniae* (ATCC 700603) ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853)) ve klinik izolatlar (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*) kullanıldı. Her bir bakteri türünden 3 farklı suş test edilmek üzere seçildi.

3.2. KİMYASALLAR VE STOK HAZIRLIĞI

Çalışmada kullanılan timol, karvakrol, eugenol ve s-perillil alkol Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden hazır olarak temin edildi. Bu kimyasallar DMSO ve\ veya serum fizyolojik içinde %3'lük konsantrasyonda hazırlandı.

3.3. MUELLER HINTON BROTH (MHB) HAZIRLANIŞI

Mueller Hinton Broth, CLSI standartlarına göre hazırlandı. 21 gram Mueller Hinton broth tozu (CM0405B), 1 litre distile su içinde çözüldü. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri +8°C'de saklandı.

3.4. % 0.9 SERUM FİZYOLOJİK HAZIRLANMASI

8.5 gram Sodyum Klorür (NaCl) terazi yardımıyla tartıldı. Daha sonra ölçülü balon veya beher içerisine 500 ml distile su alınarak 8.5 gr NaCl ilave edildi. Şişe, içindekileri karıştırmak için hafifçe döndürüldü. NaCl tamamen çözüldüğünde, son hacmi 1 litre yapmak için damıtılmış su ilave edildi. Hazırlanan normal tuzlu su

solüsyonu, solüsyonu sterilize etmek için 121°C, 1 atm basınçta 15 dakika otoklavlandı.

3.5. 0,5 MCFARLAND STANDARTLARINA GÖRE BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI

Yukarıda belirtilen bakteri suşları, 10 ml MHB'ye ilave edildi, 35-37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Mikroorganizmaların isimleri tüplerin üzerine yazılarak MHB besiyerindeki bakteri süspansiyonlarından fotometrik yöntemle 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonları hazırlandı.

3.6. MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ

Seçilen bakterilere karşı fenolik bileşiklerin MİK'lerini belirlemek için mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenol için MİK, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın hem standart hem de klinik suşları için U tabanlı 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanıldı. Her kuyucuğa 100 µL Mueller Hinton broth eklendi. İlk kuyucuğa 100 µL antimikrobiyal solüsyon eklendi ve homojenize edildi; daha sonra bu karışımın 100 uL'si bir sonraki kuyucuğa aktarılarak seri dilüsyonları yapıldı. Ardından, 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri solüsyonu kuyucuktaki son konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde dilüe edilerek her bir kuyucuğa her bakteri kültüründen 10 µL eklendi. Pozitif (MHB ve bakteriyel inokulum) ve negatif kontroller (karvakrol, timol, eugenol ve s-perillil alkol ve MHB) hazırlandı. Daha sonra plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek her kuyucuğun bulanıklığı görsel olarak gözlemlendi. Bulanıklık olmayan en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. TİMOL, KARVAKROL, S-PERİLLİL ALKOL VE EUGENOLÜN STANDART BAKTERİ SUŞLARINA KARŞI MİK BULGULARI

Standart suşlara karşı eugenol ve timol eklentili oksipropanolamin bileşiklerinin MİK değeri; *S. aureus* ve *E. faecalis* için 0.187 mg/ml, *E. coli*, *K. pnömoniae* ve *P. aeruginosa* için 0.375 mg/ml iken s-perillil alkol eklentili bileşiğin MİK değeri tüm standart suşlarda 0.375 mg/ml saptandı. Karvakrolün *K. pneumoniae*, *S. aureus* ve *E. faecalis* için MİK değeri; 3,75 mg/ml ve *E. coli* ve *P. aeruginosa* için 15 mg/ml saptandı. Timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenolün standart bakteri suşlarına karşı MİK değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: Standard suşlara karşı timol, karvakrol, perillil alkol ve eugenol MİK değerleri

Kimyasal ajan (µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Karvakrol	3.75	3.75	15	3.75	15
Eugenol	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
S-perillil alkol	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Timol	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75

4.2. TİMOL, KRAVAKROL, S-PERİLLİL ALKOL VE EUGENOLÜN KLİNİK BAKTERİ İZOLATLARINA KARŞI MİK BULGULARI

Klinik izolatlarla karşı test edilen dört bileşik *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı aynı MİK değerine (0.375 mg/ml) sahipti. S-perillil alkolün *S. aureus*'a karşı MİK değeri; 0.046-0.093 mg/ml iken *E. faecalis*'e karşı 1.07 mg/ml, karvakrolün *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı MİK değeri; 1.875 mg/ml, olarak saptandı. Timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenolün klinik bakteri izolatlarına karşı MİK değerleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: Timol, karvakrol, perillil alkol ve eugonolün klinik izolatlarla karşı MİK değerleri

Kimyasal ajan (µg/mL)	<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Karvakrol	1.875	1.875	1.875	1.875	1.875	1.875	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Eugenol	1.875	3.75	3.75	1.875	1.875	1.875	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
S-perillil alkol	0.46	0.93	0.93	1.07	1.07	1.07	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Timol	3.75	3.75	3.75	1.875	1.875	1.875	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik direnci, kalıcı, küresel bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Artan antibiyotik direnç oranlarını azaltmak için ülkelerin sağlık otoriteleri yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve eğitim programları gibi temel konular üzerinde çalışmaktadırlar (Velez and Sloand, 2016). Antibiyotik direnç sorunu, enfeksiyon kontrol uygulamalarının yetersizliğinden, çoklu geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve gereksiz kullanımı vb. sebeplerden kaynaklanmaktadır. Bu durum, Gram pozitif ve negatif bakterilerde çoklu ilaca dirençli paternlerin neden olduğu geleneksel antimikrobiyallerle tedavisi zor ve hatta tedavi edilemeyen enfeksiyonlara yol açmaktadır (Frieri et al., 2017). Bakteriyel enfeksiyonlar ve eşlik eden hastalıklarla mücadelede zorluklar vardır. Mevcut ilaçlara karşı direnç gelişmiş olması, başarılı kontrol önlemlerinin uygulanmaması ve klinik kullanımda bulunan sınırlı sayıda antibiyotik bulunması nedeni ile yeni tedavi seçeneklerinin ve alternatif antimikrobiyal tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Mühlen and Ders, 2016). Görüldüğü üzere dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların giderek artmasında dolayı tedavide zorluklar yaşanmakta ve alternatif tedavi seçenekleri gündeme gelmektedir. Mevcut alternatif seçeneklere bakıldığında; çok az sayıda yeni antibiyotik bulunduğu görülmektedir (Frieri et al., 2017). Tedavi seçenekleri daha çok mevcut antibiyotiklerin kombinasyonu veya tedavide kullanılan ilaçlara ek ajanların kullanımı şeklindedir. Bu çalışmada, yeni oksipropanolamine eklenen timol, s-perillil alkol, karvakrol ve eugenol bileşiklerinin standart suş ve klinik izolatlardan *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* üzerindeki antimikrobiyal etkisini değerlendirmiştir.

Kimyasal ajanların kimyasal yapısı ve fonksiyonel grubu antibakteriyel aktiviteyi etkiler. Önceki çalışmalar, fenolikler gibi oksijenli terpenlerin (terpenoidler), terpinen, kamfen gibi hidrokarbonlardan daha iyi antimikrobiyal aktivite sergilediğini belirtmektedir (Wattanasatcha ve diğerleri, 2012). Antimikrobiyal aktivitenin bir diğer ilgili noktası, etki mekanizmasıdır. Kullanılan kimyasalın türüne veya mikroorganizmanın türüne göre değişiklik gösterebilir. Önceki çalışmalar, polar fonksiyonel gruba sahip aromatik çekirdeklerin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu

olduğunu öne sürmüştü, ancak mekanizma tam olarak anlaşılmamıştır (Dorman ve Deans, 2000) Bununla birlikte, bazı mekanizmalar önerilmiştir. Örneğin hücre zarının parçalanması ve hücre zarındaki iyon kanallarındaki (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} veya Cl^-) değişiklikler, geçirgenliği arttırabilir ve hayati hücre içi bileşenlerin hücre dışına salınımına neden olabilir (Öz ve ark., 2015).

1998 yılında, piyasaya giren veya klinik deneme aşamasında olan antitümör veya antimikrobiyal etki gösteren ilaçların %60'ının yapısal modifikasyonlar yoluyla doğal ürünlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Shu, 1998). 2014 yılında, aşılar hariç enfeksiyöz ajanların (antibakteriyel, antifungal, parazitik ve antiviral) yaklaşık %58,30'u doğal kaynaklı veya doğal ürünlerden elde edilen ürünlerdir. Newman ve Cragg tarafından yürütülen bir çalışmada, öncü olarak hizmet edebilecek ve yeni tedavi seçeneklerinin detaylandırılması için yeni aktif ajanların kaynağı olarak doğanın önemi üzerinde durulmuştur. Bu nedenle, bunun yeni ilaçlar elde etmek için büyük potansiyele sahip bir araştırma dizisi olduğu açıktır. Bu doğal olarak oluşan maddelerden uçucu yağlar, çeşitli tıp ve eczacılık dallarının yönetiminde potansiyel uygulama ile umut verici bir biyoaktif molekül kaynağı olarak öne çıkmıştır. Sağlık sektöründe timol, perilil alkol, karvakrol ve öjenolün kapsamlı uygulaması çok umut vericidir ancak daha fazla araştırma ve analiz gerektirir.

S. aureus, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* artan antibiyotik direnç oranlarına sahip olan ve klinikte en çok karşılaşılan bakteriler arasında yer alır. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) ve DSÖ Avrupa Bölge Ofisi tarafından ortaklaşa yürütülen ve yayınlanan, Avrupa'daki istilacı izolatlardan AMR verilerini içeren Avrupa'da Antimikrobiyal direnç surveyansı 2020-2022 verilerine göre; genel olarak Avrupa Birliği/Avrupa Ekonomik Alanı'nda (AB/AEA) Gözetim altındaki bakteri türleri-antimikrobiyal grup kombinasyonları için antibiyotik direnç oranları, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da karbapenem direnci, *E. faecium*'da vankomisin direnci 2016-2020 döneminde önemli bir artış göstermektedir. *K. pneumoniae*'de üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı yüksek direnç yüzdeleri, Avrupa Bölgesi'ndeki birçok ülkede yüksek oranda karbapenem dirençli *Acinetobacter* türleri ve *P. aeruginosa* izolatlarının ortaya çıkması endişe uyandırmaktadır.

Artan antibiyotik direncine sahip klinik olarak önemli bakterilerden biri, hem toplum kökenli hem de hastane kaynaklı enfeksiyon ortamında önemli bir insan patojeni ve bakteriyemi, gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu, idrar yolu enfeksiyonları, enfektif endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (örn., impetigo, haşlanmış deri sendromu ve diğerleri), osteomyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları ve akciğer enfeksiyonları (örn., pnömoni ve ampiyem) dahil olmak üzere birden fazla enfeksiyon hastalığına neden olan *Staphylococcus aureus*'tur. *Staphylococcus aureus*'un diğer bakterilerle birlikte maruz kaldığı herhangi bir antibiyotiğe karşı olağanüstü bir direnç geliştirme yeteneğine sahip olduğu çok açıktır. Bu, ilk olarak 'penisilinaz plazmitleri' üzerinde β -laktamaz alımı ve ardından MRSA tarafından SCCmec genlerinin edinilmesiyle β -laktamaz stabil türevlerine verilen yanıt ile başlamıştır. Mutasyon yoluyla direncin kazanılması, (i) inhibitörün bağlanmasını önleyen ilaç hedefinin değiştirilmesinden, (ii) hücre içinde biriken ilaç konsantrasyonu azaltmak için kromozomal olarak kodlanmış çoklu ilaç direnci effluks pompalarının ekspresyonu ve (iii) hücrenin yapısını ve bileşimini değiştiren çoklu mutasyonlardan kaynaklanabilir (Foster, 2017).

P. aeruginosa, antibiyotik direnci artan başka bir bakteridir. Gram negatif, aerobik, kapsüllü, spor oluşturmeyen, hem bağışıklığı sağlam hem de bağışıklığı baskılanmış konaklarda özellikle yanık yaraları, kronik yaralar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (Mulcahy et al., 2014; Kerr and Snelling, 2009). *P. aeruginosa*, çevrede yaygın olarak bulunmakta ve alkol kullanım bozukluğu veya diabetes mellitusu olan hasta popülasyonlarında pnömoni ile ilişkilendirilmektedir (Effah et al., 2020).

Enterobacterales familyasından *K. pneumoniae*, bu patojenin yüksek virülansı, dinamik olarak gelişen antibiyotik direnci ve sınırlı tedavi yöntemleri nedeniyle mortalitesi yüksek ve hastanede yatış süresi uzun olan çok sayıda kronik hastane enfeksiyonunun nedenidir. *E. coli*'nin bağırsak normal florasının bir parçası olduğu ve bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık %0,1'ini oluşturduğu bilinmektedir (Eckburg et al., 2005), ancak aynı zamanda insanlarda çeşitli bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklara neden olabilir. Bazı suşlar, böbrek yetmezliği ve septik şok gibi ciddi hastalıklara neden olur (Mueller and Tainter, 2022).

Timol, simen ve karvakrol izomerleri doğal olarak oluşan bir fenol monoterpen türevidir. Timol, özellikle kekikte (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) bulunan uçucu yağlarının ana bileşenlerinden biridir. Antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antelmintik, antiviral, antioksidan, balgam söktürücü, antispazmodik, gaz giderici, terletici, yatıştırıcı, anti-romatizmal, anti-kanser, anti-hiperlipidemik ve anti-hiperglisemik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Timol ve karvakrolün geniş ölçüde dikkate değer bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu öne sürülmüştür (Yamazaki et al., 2001). Eugenol (EUG); *Ocimum tenuiflorum*, *Cassia fistula*, *Zieria smithii* ve *Pimenta racemosa*'dan ekstrakte edilen geniş biyolojik aktivitesi nedeniyle tedavi edici özelliklere aday bir madde olması nedeniyle hedef molekül olarak kullanılan doğal bir maddedir. Farmasötik, gıda, tarım ve kozmetik endüstrilerinde sayısız uygulama ile umut verici antimikrobiyal ve antioksidan etki göstermiştir (saliva et al. 2018).

Karvakrolün standart bakteri suşlarına karşı MİK değerleri incelendiğinde; *S. aureus*, *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı benzer etkiye sahip olduğu ve *E. coli* ile *P.aeruginosa* bakterilerine karşı da benzer ancak daha az etkili bulunmuştur. Karvakrol özellikle *P. aeruginosa* ve *E. coli* 'e karşı en az etkili (15 µg/mL) ajan olarak bulunmuştur. Timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenolün klinik bakteri suşlarına karşı MİK değerleri incelendiğinde; *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı benzer etkiye (3.75 µg/mL) sahip olduğu görülmüştür. Karvakrol ve eugenolün *S. aureus* ve *E. faecalis* (1.87 µg/mL) için benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Timolün *S. aureus* ve *E. faecalis* için en etkili (1.87 µg/mL) ajan olduğu belirlenmiştir. Literatürde oksapropanolamine eklenmiş olan timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenolün bileşiklerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Mevcut çalışmalar daha çok timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenolün tek başına antimikrobik etkisine odaklanmıştır. Yapılan çalışmalarda birkaç *S. aureus*'a karşı karvakrol için (10 µg/mL) benzer MİK değerleri rapor edilmiştir (Nostro et al., 2004; Bnyan et al., 2014; Cirino et al., 2014). Ancak literatürde *S. aureus* suşları için daha yüksek (300 ila 625 µg/mL arasında değişen) MİK değerleri bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. (Mathela et al., 2010; Cirino et al., 2014).

Bu tez çalışmasında hem timol ve eugenolün hem *S. aureus* ve *E. faecalis* (1.87 µg/mL) için; hem de *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* (3.75 µg/mL) için benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Timol ve eugenol *S. aureus* ve *E. faecalis* için en etkili (1.87 µg/mL) ajanlar olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda timol ile ilgili olarak, MİK değerlerimiz *S. aureus* suşları için bildirilenlerden çok daha düşüktür: 10 µg olmasına rağmen 580µg/mL (Nostro et al., 2004) ve 625µg/mL (Cirino et al., 2014) /mL de rapor edilmiştir (Wattanasatcha et al., 2012), Hecker ve diğerleri. ve Cuarda ve ark. benzer değeri bildirmiştir (sırasıyla 150 µg/mL, 200 µg/mL). Eugenol ile ilgili olarak, *S.aureus* için çok daha yüksek MİK (1000 µg/mL) rapor edilmiştir (silva et al., 2018). Candelaria et al., *E.coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı tüm kimyasallarda çok daha yüksek MİK değerleri bildirmiştir. Söz konusu bu çalışmalarda timol ve eugenolün tek başına kullanıldığı göz önüne alınarak sonuçlar yorumlanmalıdır.

S-perillil alkolün standart bakteri suşlarından tüm mikroorganizmalara karşı aynı etkiye (3.75 µg/mL) sahip olduğu görülmüştür. Klinik bakteri suşlarına karşı MİK değerleri incelendiğinde; *S.aureus* ve *E. faecalis* bakterilerine karşı en etkili (0.46-0.93 µg/mL, 1.07 µg/mL, sırasıyla) bulunmuştur. Literatürde s-perillil alkolün eklendiği oksapropanolamin bileşiklerinin antimikrobik etkisinin incelendiği bir çalışmaya ulaşılammıştır.

Çalışmamızda da görüldüğü gibi, olan timol, karvakrol, s-perillil alkol ve eugenol bileşikleri *S.aureus* ve *E.coli* dahil olmak üzere bazı mikroorgnizmalara karşı mikropalara karşı etkilidir. Ayrıca bu bileşikler FDA tarafından güvenli kabul edildikleri ve geçmiş yıllarda geleneksel alternatif tıbbın bir parçası oldukları için geniş çapta kabul görmüştür. Gıda koruyucuları olarak kullanım için potansiyel adaylardır. Buna rağmen, tat değerlendirmesi ve toksisite profilleri hakkında bilgi eksikliği nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Ancak, genel olarak güvenli olarak kabul edilmekle birlikte, doğal ürünler ve EY, antimikrobiyal ajanlar olarak kullanıldıklarında içlerindeki metabolitlerin çeşitliliği nedeniyle tamamen güvenilir olmadığını savunan yayınlar da vardır (Giweli et al., 2012). Gelecekte, her bir EY için spesifik olan tam etki mekanizmasını ve bileşenleri arasındaki sinerjik

mekanizmalarını ve kronik veya subkronik kullanımdan sonra mikropların EY'ya davranışını belirlemek için araştırma çalışmaları yapılmalı görüşünde olan araştırmacılar mevcuttur (Chouhan et al., 2017).

Literatürde; timol, karvakrol, s-perilil alkol ve eugenol eklentili oksipropanolamin bileşiklerinin antibakteriyel etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu çalışmada timol, karvakrol, s-perilil alkol ve eugenol eklentili oksipropanolamin bileşiklerinin antibakteriyel etkilerinin incelenmiş olup bu bileşiklerin hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda bile antibakteriyel etkisinin olduğu söylenebilir. Ayrıca, elde edilen bu verilerden tedavide ve yeni antibiyotikler geliştirilirken yararlanılabilir. Ancak, bu çalışma sadece in vitro bir çalışma olduğundan kesin yorumların çıkarılabilmesi için bu konuda in vivo deneyleri de içeren daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Amiri H. (2012). Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three Thymus Species. *Hindawi* , 728065–536

Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations, *Antimicrob Chemother* 49(6):1049.

Azizi Z., Ebrahimi S., Saadatfar E., Kamalinejad M., Majlessi N. (2012). Cognitive-enhancing activity of thymol and karvakrolin two rat models of dementia. *Behavioural Pharmacology* 23 (3), pp.241–249.

BabarAli, Naser AliAl-Wabel, SaibaShams, AftabAhamad, Shah AlamKhan, Firoz Anwar (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 5(8).

Babu KGD, Kaul VK. (2005). Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour Frag J* (20)222–31.

Baj T., Biernasiuk A., Wróbel R., Malm A. (2020). Chemical Composition and In Vitro Activity of *Origanum Vulgare* L., *Satureja Hortensis* L., *Thymus Serpyllum* L. And *Thymus Vulgaris* L. Essential Oils towards Oral Isolates of *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*. *Open Chem.* 18 (1), 108–118.

Balows A, Hausler W J, Herrmann K L, Isenberg H D, Shadomy H J. Manual of clinical Microbiology (1991). 5th ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology.

Benabdelkader T, Zitouni A, Guitton Y, Jullien F, Maitre D, Casabianca H (2011). Essential oils from wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L. Composition, chemical variability, and in vitro biological properties, *Chem Biodivers* (8)937–53.

Braga PC (2005). Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *Giornale Italiano di ostetricia e ginecologia* 27 (7/8), 267–272.

Burt S, Vlieland R, Haagsman H, Veldhuizen E (2005). Increase in activity of essential oil components karvakrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *J. Food Prot.* (68) 919-926.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol* (94) 223-253.

Candelaria-Dueñas S, Serrano-Parrales R, Ávila-Romero M, Meraz-Martínez S, Orozco-Martínez J, Ávila-Acevedo JG, García-Bores AM, Cespedes-Acuña CL, Peñalosa-Castro I, Hernandez-Delgado T (2021). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Some Components of the Essential Oils of Plants Used in the Traditional Medicine of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Puebla, México. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*,10(3), 295.

Carson CF, Riley TV (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol*(78)264–269

Cassel E, Rubem MF, Vargas A (2006). Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation, *J Mexican Chem Soc* (50)126–9.

Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas G-J, Haroutounian S. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem*, 52: 8261-8267.

-Chouhan S., Sharma K., Guleria S.(2017) Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* (4)58.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) *J. Appl. Microbiol* (88)170–175.

D'Alessio PA, Mirshahi M, Bisson JF, Bene MC (2014). Skin repair properties of d-Limonene and perillyl alcohol in murine models. *AntiInflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 13(1):29-35.

Da Silva, F, Monte F, de Lemos T, do Nascimento P, de Medeiros Costa A K, De Paiva L (2018). Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Chemistry Central journal*, 12(1), 34.

De Lira Mota KS, De Oliveira Pereira F, De Oliveira WA, Lima IO, De Oliveira Lima E (2012). Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. *Molecules* (17)14418–14433

Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130(1)107-115

Dhifi W, Bellili S, Mnif W (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review, *Medicines* 3(4):25.

Dorman H.J.D., Deans S.G.(2000) Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol* (88)308–316.

Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol* (88)308–316.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal Microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–1638.

Effah, CY, Sun T, Liu S, Wu Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. *Annals of clinical Microbiology and antimicrobials*, 19(1), 1.

Elyemni M , Louaste B, Nechad I, Elkamli T, Bouiaa A, Taleb M, Chaouch M, Eloutassi N (2019) Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation, *The Scientific World Journal*(23) 176-200.

Figueiredo R, Ortega AC, González Maldonado LA, Castro RD, Ávila-Campos MJ, Rossa C, Aquino SG (2020). Perillyl alcohol has antibacterial effects and reduces ROS production in macrophages. *Journal of applied oral science* (28)123-128.

Foster TJ (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.*1;41(3):430-449.

Frieri M, Kumar K, Boutin A (2017). Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*, 10(4):369-378.

Gilmore M.S, Lebreton F, van Schaik W (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr. Opin. Microbiol*(16)10–16.

Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H (2004). Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* (18) 990-995.

Giweli A, Džamić AM, Soković M, Ristić MS, Marin PD (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. *Molecules (Basel, Switzerland)* 17(5), 4836–4850.

Gould IM, Bal AM (2014). New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence*. 4(2),pp.185–191.

Gounaris Y, Skoula M, Fournaraki C, Drakakaki G, Makris A (2002). Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum × intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochem. Syst. Ecol.* (30) 249-258.

Guarda A, Rubilar Jf, Miltz J & Galotto MJ (2011). The antimicrobial activity of MİKroencapsulated thymol and carvacrol. *Int J Food MİKrobiol* (146) 144-150.

Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães M, Endringer, DC, Fronza M, Scherer R (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(13)123-127.

Guynot ME, Ramos AG, Seto L, Purroy P, Sanchis V, Marin S (2003). Antifungal activities of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *J. Appl. microbiol.* (94) 893-899.

Heckler C, Sant'anna V, Brandelli A, Malheiros P (2021). Combined effect of carvacrol, thymol and nisin against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis, *An Acad Bras Cienc* 93(4).

Hercules Sakkas and Chrissanthy Papadopoulou (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils, *J. Microbiol. Biotechnol* 27(3), 429–438.

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components, *Front Microbial* 3:12.

Javadpour MM, Juban MM, Lo WCJ, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM., McLaughlin ML (1996) De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* (39)3107–3113.

Jondle CN, Gupta K, Mishra BB, Sharma J (2018) *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery. *PLoS Pathog.* 14(10).

Kerr KG, Snelling AM (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect.* 73(4):338-414.

Kokkini S, Karousou R, Dardioti A, Krigas N, Lanaras T (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* (44) 883-886.

Kosar M, Dorman HJD, Hiltunen R (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem* 91:525–33.

Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I (2020). Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(18), 4125.

Lambert RJV, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl. Microbiol.* (91) 453-462.

Lawley TD, Walker AW (2013). Intestinal colonization resistance. *Immunology*(138)1–11.

Lee Ventola C (2015). The Antibiotic Resistance Crisis, *Pharmacy and Therapeutics* **40**(4), 277-283.

Li XM, Tian SL, Pang ZC, Shi JY, Feng ZS, Zhang YM (2009). Extraction of Cuminumcuminum essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chem* (115)1114–9.

Luque de Castro MD, Jiménez-Carmona MM, Fernández-Pérez V (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants, *TrAC Trends Anal Chem* (18)708–16.

Maki DG, Agger WA (1988). Enterococcal bacteremia: Clinical features, the risk of endocarditis, and management, *Medicine*(67) 248–269.

Marchese A, Arciola CR, Coppo E, Barbieri R, Barreca D, Chebaibi S, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM, Daglia M (2018). The Natural Plant Compound Carvacrol as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent: Mechanisms, Synergies and Bio-Inspired Anti-Infective Materials, *Biofouling* (34)630–656.

Martin R.M., Bachman M.A.(2018) Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*, *Front. Cell. Infect. Microbiol* (8)4.

Mohamed SH, Mohamed MSM, Khalil MS, Azmy M, Mabrouk MI (2018) Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumonia*, *J. Appl. Microbiol*(125)84–95.

Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles. 6th ed. AFNOR, Association Française de Normalisation; Paris, France: 2000

Mueller M, Tainter CR. *Escherichia coli*. [Updated 2021 Oct 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.

Mukhtar, Y. M., Adu-Frimpong, M., Xu, X., & Yu, J. (2018). Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Bioscience reports*, 38(6).

Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease, *Microbial ecology*, 68(1), 1–12.

Murray B (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev*; 3(1): 46–65.

Nataro JP, Kaper JB. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin Microbiol Rev*. (1):142-201.

Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance, *FEMS Microbiol Rev*. 41(3):252–275.

Nazar FN, Videla EA, Marin RH (2019). Thymol supplementation effects on adrenocortical, immune and biochemical variables recovery in Japanese quail after exposure to chronic heat stress, *Animal* (13)318–325

NCCLS Approved Standard: ASM-2, *Performance Standards for Antimicrobial disc Susceptibility Tests*(1979), 2nd ed., National Committee for Clin. Lab. Standards

Nisar MF, Khadim M, Rafiq M, Chen J, Yang Y, Wan CC (2021). Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review, *Oxidative medicine and cellular longevity* (14)2497354.

Otto M. (2013). Community-associated MRSA: what makes them special?. *International journal of medical Microbiology IJMM*, 303(6-7), 324–330.

Oz M., Lozon Y., Sultan A., Yang K.H.S., Galadari S.(2015) Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacol. Ther*;152:83–97.

Paczosa MK, Mecsas J (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 80(3), 629–661.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 37(1):177-192

Pina-Vaz C, Goncalves-Rodrigues A, Pinto E, Costa-de Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L (2004). Antifungal activity of thymus oils and their major components. *J. Eur. Acad. Dermatol. VenerEYL.* (18) 73-78.

Pitt TL, Barer MR (2012). Classification, identification and typing of micro-organisms. *Medical Microbiology*, 24–38.

Rasigade JP, Vandenesch F (2014). *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues, *Infect Genet Evol.* ,21:510-533.

Reverchon E, Senatore F. (1992). Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction, *Flavour Frag J* (7)227–30.

Sagdic O (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *LWT Food Sci. Technol.* (36) 467-473.

Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Mar Contreras M, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F, Sharifi-Rad J (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses, *phytotherapy research* 32(7) 1688-1706

Senorans FJ, Ibanez E, Cavero S, Tabera J, Reglero G. (2000). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *J Chromatogr A* 870:491–9.

Sikkema J, de Bont JAM., Poolman B (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* (269) 8022–8028

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens, *Lett. Appl. microbiol.* (26) 118-122.

Solórzano SF, Miranda NMG (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents, *Curr. Opin. Biotechnol.* (23) 136–141

Spellberg B, Gilbert DN (2014). The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clinical Infectious Diseases*, 59(2) 71–75.

Surburg H, Panten J. *Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses*, (2016) 6th ed. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Suresh P, Atmika P, Hiroshi H, Akihiko Ano O, Toshihiro I, Jochen B, Kazuhisa S (2021). "Complete genome sequence and comparative genomics analysis of *Enterococcus faecalis* EF-2001, a probiotic bacterium". *Genomics*. 113 (3): 1534–1542

Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control* 21, 1199–1218.

Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral

potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog.* (134)103580.

Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus*. [Updated 2022 Feb 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022

Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A, Trindade H (2020). Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different *Thymus* species, *Phytochemistry* (169)112126.

Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Phytomedicine* **17** (2), pp.142–145.

Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 28(3):603-61

Tongnuanchan P, Benjakul S (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation, *journal of food science* 79(7) 1231-1249.

Ulanowska M, Olas B (2021), Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review, *International j of molecular sci* 22(7)3671.

Velez R, Sloan E (2016) Combating antibiotic resistance, mitigating future threats and ongoing initiatives, *J Clin Nurs*(1)2

Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*, *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6278.

Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent, *Int. J. Pharm* (434)360–365.

Wilson MG, Pandey S. *Pseudomonas Aeruginosa*. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls* Publishing; 2022 Jan.

Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N (2004), Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiol.* (21)283-289.

Youssefi MR , Tabari MA, Esfandiari A, Kazemi S, Moghadamnia A, Sut S, Dall'Acqua S, Benelli G, Maggi F (2019). Efficacy of Two Monoterpenoids, Carvacrol and Thymol, and Their Combinations against Eggs and Larvae of the West Nile Vector *Culex pipiens*, *Molecules* (24)1867.