



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

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNDE
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİ-BİYOFİLM
AKTİVİTE**

GÜLBeyAZ ALTUNBOĞA

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2024



**BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE ANTİ-
BİYOFİLM AKTİVİTE**

Gölbeyaz ALTUNBOĞA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2024

Gülbeyaz ALTUNBOĞA tarafından hazırlanan “BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE ANTİ-BİYOFİLM AKTİVİTE” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Berrin ÖZÇELİK

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

.....

Başkan: Prof.Dr.Nedim SULTAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ufuk Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 13/06/2024

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Advije Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gölbeyaz ALTUNBOĞA

14/06/2024

BAZI TIBBİ BİTKİ EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE ANTİ-BİYOFİLM AKTİVİTE

(Yüksek Lisans Tezi)

Gülbeyaz ALTUNBOĞA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2024

ÖZET

Günümüzde antimikrobiyal direnç dünya genelinde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle araştırmacılar farklı formülasyonlara sahip antimikrobiyal ajanlar, antiseptikler ve dezenfektanlar geliştirerek direnç sorununu çözmeye çalışmaktadırlar. Bu çalışmada, bazı tıbbi bitkisel ekstraların antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır. *Echium vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (toprak üstü), *Phytolacca americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve)'nın metanol ekstralarının; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Trycophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, ve *Microsporum gypseum* üzerindeki antibakteriyel, antifungal ve antidermatofit aktiviteleri mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bakterisit/fungusit ve bakteriostatik/ fungustatik konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla MİK ve üstü dilüsyonlarında katı besiyerine ekim yapılarak değerlendirilmiş ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle kantitatif inhibisyon konsantrasyonları (IC₅₀) 600-690 nm absorbansta ELİZA mikropleyt okuyucuda ölçüm yapılmıştır. Ampisilin, gentamisin, levofloksasin, flukonazol, ketokonazol, terbinafin, grizeofulvin ve itraconazol kontrol ajanı olarak kullanılmıştır. Tüm ekstralar, test edilen mikroorganizmalara karşı MİK; 32-256 µg/mL aralığında aktivite göstermiştir. Resazurin kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde IC₅₀; 14-72 µg/mL aralığında inhibisyon değerleri göstermiştir. Tüm ekstralar MİK; ≥512/-'da minimum bakteristatik/-sidal (MBS/MBC; µg/mL) ve fungistatik/-sidal (MFS/-MFC; µg/mL) aktivite göstermiştir,

Bilim Kodu : 1039
Anahtar Kelimeler : Antimikrobiyal, Antibiyofilm, *Echium*, Farmasötik Mikrobiyoloji, *Phytolacca*
Sayfa Adedi : 60
Danışman : Prof. Dr. Berrin ÖZÇELİK

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF SOME MEDICAL PLANT EXTRACTS

(M. Sc. Thesis)

Glbeyaz ALTUNBOĞA

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2024

ABSTRACT

Today, antimicrobial resistance continues to be a important problem in the treatment of infectious diseases worldwide. For this reason, researchers are trying to solve the resistance problem by developing antimicrobial agents, antiseptics and disinfectants with different formulations. In this study, some medicinal herbal extracts were tested for antimicrobial and antibiofilm activity. The antibacterial, antifungal and antidermatophyte activities of methanol extracts of *Echium vulgare* (root), *E. vulgare* (aerial part), *E. plantagineum* (root), *E. plantagineum* (aerial part), *E. orientale* (root), *E. orientale* (aerial part), *Phytolacca americana* (leaf) and *P. americana* (fruit) against bacteria and fungi such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Trycophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum gypseum* were evaluated by microdilution method. In addition, in order to determine the bactericidal/fungicide and bacteriostatic/fungistatic concentrations, solid media were inoculated at MIC and above dilutions, and quantitative inhibition concentrations (IC₅₀) were measured using the colorimetric microdilution method on an ELISA microplate reader at 600-690 nm absorbance. Ampicillin, gentamicin, levofloxacin, fluconazole, ketoconazole, terbinafine, griseofulvin and itraconazole were used as standard antibacterial and antifungal drugs. All extracts showed MIC values in the range of 32-256 µg/mL against the bacteria and fungi tested. In the microdilution method; IC₅₀ inhibition curves obtained with the Resazurin Microplate Assay showed results in the range of 14-72 µg/mL All extracts shows both minimum bacteriostatic/-cidal (MBS/MBC; µg/mL) and fungistatic/-cidal (MFS/-MFC; µg/mL) activity at values lower than MIC; ≥512/-.

Science Code : 1039

Key Words : Antimicrobial, Antibiofilm, *Echium*, Pharmaceutical Microbiology, *Phytolacca*

Page Number : 60

Supervisor : Prof. Dr. Berrin ZĐELİK

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim süresince desteğini, akademik bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Berrin ÖZÇELİK'e,

Her zaman yanımda olan, beni akademik hayatım boyunca her an destekleyen her şeyimi borçlu olduğum sevgili anneme desteklerinden dolayı kalpten teşekkür ederim.

Tezim, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi tarafından Proje kodu: TYL-2024-9449, ID: 9449 numaralı proje olarak desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyofilm.....	3
2.2. Biyofilm Oluşumu	4
2.2.1. Bakterilerde geri dönüşümlü tutunma	4
2.2.2. Bakterilerde geri dönüşümsüz tutunma	5
2.2.3. Üreme ve bölünme.....	6
2.2.4. Ayrılma.....	6
2.3. Hastane Enfeksiyonları ve Biyofilm	7
2.4. Anti-Biyofilm Aktiviteleri.....	8
2.4.1. Bakteriyel iletişim inhibisyon aktivitesi	8
2.4.2. Stres yanıt yolağının hedef alınması.....	8
2.4.3. Ekstraselüler polisakkarit maddenin enzimler aracılığıyla dağıtılması....	9
2.4.4. Peptidoglikan tabakanın hedef alınması	9
2.4.5. Lipopolisakkarit çözünmesi veya nötralizasyonunun hedef alınması	10
2.4.6. C-di-GMP sinyal sisteminin hedef alınması.....	10

	Sayfa
2.4.7. Biyofilm tabakanın hedef alınması.....	11
2.4.8. Adhezyon molekülü sentezi ve fonksiyonunun hedef alınması	11
2.4.9. Membran geçirgenliğinin hedef alınması	12
2.5. Anti-Biyofilm Aktivite Yöntemleri	12
2.6. Bakteriyel Direnç.....	14
2.6.1. Doğal direnç	14
2.6.2. Kazanılmış direnç	15
2.6.3. Kazanılmış direnç mekanizmaları	15
2.7. Antimikrobiyal Aktivite Testi Yöntemleri	16
2.7.1. Difüzyon yöntemleri.....	17
2.7.2. Dilüsyon yöntemleri	18
2.7.3. Dilüsyon ve difüzyon	18
2.8. Biyoaktiviteleri Araştırılan Türkiye’de Yetişen Bitkiler.....	19
2.8.1. <i>Echium vulgare</i>	19
2.8.2. <i>Echium plantagineum</i>	20
2.8.3. <i>Echium orientale</i>	21
2.8.4. <i>Phytolacca americana</i>	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. Bitkisel Ekstreler	23
3.2. Mikrobiyolojik Analiz	23
3.2.1. Gereç ve yöntemler.....	23
3.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri	25
3.3.1. İnokulum hazırlığı	26
3.3.2. Yöntem	26
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	41

	Sayfa
6. SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Gram-pozitif mikroorganizmalarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon, minimum bakteriyostatik/-sidal değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon değerleri	34
Çizelge 4.2. Gram-negatif mikroorganizmalarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon, minimum bakteriyostatik/-sidal değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon değerleri	35
Çizelge 4.3. Maya benzeri funguslarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon, minimum fungistatik/-sidal değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon değerleri	38
Çizelge 4.4. Dermatofitlerde, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem tahlili kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon, minimum fungistatik/-sidal değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon değerleri	39

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yüzey ve bakteri arasında oluşabilecek bağ türleri	6
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları.....	7
Şekil 2.3. Bakteriyel biyofilm oluşumunun real time cell analyzer-RTCA gerçek zamanlı grafiği.	13
Şekil 2.4. Uygulama prensiplerine göre antimikrobiyal aktivite test yöntemleri	17
Şekil 4.1 . <i>S. aureus</i> ’a karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	36
Şekil 4.2 . <i>B. subtilis</i> ’e karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	36
Şekil 4.3 . <i>E. faecalis</i> ’e karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	36
Şekil 4.4 . <i>S. mutans</i> ’a karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	36
Şekil 4.5 . <i>E. coli</i> ’ye karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	37
Şekil 4.6. <i>P. aeruginosa</i> ’ya karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	37
Şekil 4.7. <i>K. pneumoniae</i> ’ya karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	37
Şekil 4.8. <i>A. baumannii</i> ’ye karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	37
Şekil 4.9. <i>C. albicans</i> ’a karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri.....	40
Şekil 4.10. <i>C. parapsilosis</i> ’e karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri	40
Şekil 4.11. <i>C. krusei</i> ’ye karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri	40
Şekil 4.12. <i>T. rubrum</i> ’a karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri	40
Şekil 4.13. <i>E. floccosum</i> ’a karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri	40
Şekil 4.14. <i>M. gypseum</i> ’a karşı <i>E. vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>E. orientale</i> , <i>P. americana</i> metanol ekstreleri % inhibisyon değerleri	40

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Echium vulgare</i>	19
Resim 2.2. <i>Echium plantagineum</i> L.	20
Resim 2.3. <i>Echium orientale</i>	21
Resim 2.4. <i>Phytolacca americana</i>	22

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
DMSO	Dimetilsülfoksit
EtOH	Etanol
H₂O	Su
MeOH	Metanol
mL	Mililitre
mm	Milimetre
°C	Santigrat Derece
Vol	Hacim

Kısaltmalar	Açıklamalar
atcc	Amerikan Tip Kültür Koleksiyon
cfu	Colony Forming Unit
ci	Cell Index
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dna	Deoksiribonükleik Asit
e-dna	Ekstraselüler Deoksiribonükleik Asit
eps	Ekstrasellüler Polimerik Matriks
mbk	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
mha	Müller Hinton Agar
mik	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCPF	National Collection of Pathogenic Fungi
rskk	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
rtca	Real Time Cell Analyzer

1. GİRİŞ

Günümüzde antimikrobiyal direnç dünya genelinde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli bir sorun olması güncelliğini korumaktadır. Daha geniş kapsamlı tedaviler gerektiren, biyofilm üreten suşlardan kaynaklanan enfeksiyonlar da bu sorunun farklı bir yönüdür. Mikrobiyal direnç sorunu, hastanelerde görülen salgın sorunu olmaktan çıkmış; acil bakım, yoğun bakım ünitelerinde ve toplum kökenli enfeksiyonlarda da görülür olmuştur (Cornaglia ve Rossolini, 2009). Güncel araştırmalar tüm bu sorunları çözmeye yönelik farklı formülasyonlara sahip doğal kaynaklı veya sentetik bileşiklerden türetilmiş antimikrobiyal ajanlar, antiseptikler ve dezenfektanlar geliştirmeye yönelik sürdürülmektedir.

Tıbbi bitkiler tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de yeni antimikrobiyal araştırmalarda kaynaktır. Araştırmamızda antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilecek olan *Echium* ve *Phytolacca* türlerinin Çin, Amerika ve İtalya gibi birçok ülkede geleneksel tıpta antimikrobiyal kullanımı bulunmakla birlikte bu bitkilerin farklı ekstre türleri ile ilgili farklı yöntem ve çözücülerin kullanıldığı çok az sayıda antimikrobiyal çalışmaya ulaşılmıştır. Ülkemizde Türkiye'nin kuzey kesimlerinde ve Anadolu'nun iç kesimlerinde yetişen *Echium vulgare* ve *Echium orientale*, kıyı kesimlerinde yetişen *Echium plantagineum* ve Marmara bölgelerinde yetişen *Phytolacca americana* türleri çalışmamıza dahil edilmiştir.

Bitki türlerinde yapılan araştırmalar bölgeseldir ve coğrafyaya göre bitki fitokimyasının gösterdiği değişkenlik sonucunda biyoaktivitede farklı mikroorganizmalara karşı farklı aktivite sonuçları görülmektedir. Bitkilerin aktif bileşenleri için etkin çözücüler diğer önemli faktördür. Araştırmamızda Türkiye'de yetişen bitkilerin metanol ekstreleri kullanılmıştır.

Çeşitli ajanların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan disk diffüzyon, agar dilüsyon, makrodilüsyon gibi birçok farklı yöntem vardır. Mikrodilüsyon yöntemi, çoklu dozlarda ve düşük konsantrasyonlarda çalışmaya imkân vermesi, ekonomik olması ve duyarlı sonuçlar vermesi nedeniyle en çok tercih edilen yöntemlerden birisidir. Tezde, Türkiye'de yetişen *Echium vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *Phytolacca Americana* metanol ekstrelerinde *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Trycophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, ve *Microsporum gypseum*'a karşı antimikrobiyal ve anti-biyofilm aktivite belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon ve kantitatif spektrofotometrik yöntemleri kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilm

Biyofilm; bakteriler, arkealar, mayalar, küfler, algler ve protozoaların birbirlerine veya yüzeylere tutunmalarını sağlayan bir tür hücre dışı polimerik matrikstir (Tülüce, Temelli ve Eyigör, 2021). EPS (extracellular polymeric substance) dediğimiz bu hücre dışı polimerik madde matriksini hücre dışı DNA (extracellular DNA: eDNA), polisakkaritler, proteinler ve glikolipidler oluşturmaktadır. EPS biyofilm matrisinin yapısındaki bakteri kolonilerini bir arada tutarak ve biyofilm yapılarının stabilitesini artırarak destek olur. EPS'nin biyofilm oluşumuna bir başka katkısı ise çeşitli yaşam formlarını barındırabilmesidir. Farklı türler, farklı EPS bileşenleri üretebilir ve bu da biyofilm matrisinin çeşitliliğine katkıda bulunur. Bu bileşenler mikroorganizmaların yüzeye tutunmasında, biyofilmlerin oluşumunda, biyofilm içindeki mikroorganizmalar arasındaki iletişimin sağlanmasında, virülans özellik kazanmasında ve mikroorganizmaları çevre koşullarından korumada görev alır (Akçelik, N. ve Akçelik, M., 2017). Önemli biyofilm bileşenlerinden eDNA ise bakterileri konak bağışıklık sisteminden ve antimikrobiyal ajanlardan koruyan yapıdır (Devaraj ve diğerleri, 2019). Biyofilm yapısında önemli bir başka molekül c-di-GMP (Siklik Diguanozin Monofosfat), ikincil haberci moleküldür. Hücreler, dış koşullara yanıt olarak c-di-GMP seviyelerini değiştirirerek bakterilerde biyofilm oluşumunu düzenlemektedirler. Yüksek seviyelerde c-di-GMP, biyofilm oluşumunu teşvik ederken, düşük seviyeler biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir. Aynı zamanda c-di-GMP, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin düzenlenmesi ve biyofilm oluşturan bakteriler arasındaki iletişimin düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel tepkilere neden olabilmektedir (Almblad, 2019; Cotter, 2007; Ha, 2015; Zhang, 2018). c-di-GMP molekülleri tarafından düzenlenen hücre yüzeyindeki flagella ve pilus gibi hücresel uzantılar bazı bakteriler tarafından biyofilm oluşumu sırasında hareket etmek, biyofilm mimarisini oluşturmak ve yüzeye tutunmak için kullanılmaktadır (Barken ve diğerleri, 2008). Araştırmacılar biyofilm oluşumunu gözlemlemek için bakteriyel hücre yüzeyinde bulunan ve pilusların oluşumunda rol oynayan genlerden biri olan PilH geni silinen bir *P. aeruginosa* suşu üretmişlerdir. Üretilen mutant suşun, normale göre daha büyük, yoğunluğu azalmış, düzensiz mantar şekilli biyofilm yapıları oluşturduğunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar PilH genini normal seviyelere getirdiklerinde, mutant suşun normal suş gibi davrandığını gözlemlediklerini bildirmiştir (Barken ve diğerleri, 2008). Biyofilm

oluşumunda önemli olan bir diğer yapı Quorum Sensing sistemleri ise bakteriler arasındaki iletişimi sağlayan bir mekanizmadır. Bu genler, bakterilerin besin kaynağı ve miktarı, popülasyon yoğunluğu, ozmolarite, pH gibi çevresel faktörlerde değişiklik meydana geldiğinde bu değişime adapte olmak amacıyla metabolizmasında birtakım düzenlemeler yapmasını ve bakteri popülasyonunun yoğunluğuna duyarlılık göstermesini sağlamaktadır (Preda ve Săndulescu, 2019). Bakterilerde çevreden gelen bir uyarı ile stres yanıtı genleri devreye girmekte ve bakterilerin çevresel stres faktörlerine uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Bu genler, bakterilerin biyofilm oluşturarak çevresel stresten korunmasına ve biyofilm matrisinin stabilitesini artırmalarına yardımcı olmaktadır. Yapılan bir araştırmada stress yanıtı genlerinin artmasıyla orantılı olarak biyofilm oluşumu ve antibiyotik direncinin de arttığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Lories ve diğerleri, 2020).

Biyofilmler hemen hemen her yüzeyde gelişebilir. Yapılan araştırmada İtalya'da deniz seviyesinden 60 metre derindeki kaplıca sularında biyofilmlerin varlığı bildirilmiştir (Jones, Tobler, Schaperdorth, Mainiero ve Macalady, 2010). Donmuş buzullarda biyofilmler bulunduğu da araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. 2009'da Antarktika kıyılarından toplanan bir buzul örneğinde yeni bir bakteri türü olan *Antarcticimonas flava*'nın oluşturduğu biyofilm gösterilmiştir (Yang, Oh, Chung ve Cho, 2009). Bu çok sıcak ve soğuk koşulların dışında, yüksek metal içeren, yeterli besin olmayan, aşırı asidik ortamlarda da biyofilmler gözlemlenebilmektedir. Çok çeşitli nem düzeylerine sahip ortamlarda da, biyofilm varlığı tespit edilmiştir (Campos, 2009; Dojani, 2007).

2.2. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumunun ilk adımı planktonik hücrelerin yüzeye tutunmasıdır. Tutunma, hücre yüzeyinde bulunan fimbria, pili, flagella gibi uzantılar ve uzantılarda bulunan adhezin proteinleri ile gerçekleşmektedir. Hücresel uzantılar hücre tipine, reseptöre veya yüzeye özgü tutunma yeteneği sağlayan protein yapılarıdır. Bu spesifik tutunma yeteneği, bakterilerin çevresel koşullara ve hücre tiplerine uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Adhezin proteinleri ise bakterilerin yüzeylere tutunmasını sağlayan moleküler yapılarıdır. Adhezin proteinleri kimyasal olarak hedef yüzeydeki moleküler yapılarla hidrojen bağları, iyonik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri gibi kimyasal etkileşimlere girebilmektedir. Adhezin proteinleri esnek bir yapıya sahiptir bu sayede hücrenin yüzeylere uyum sağlamasını kolaylaştırmaktadır (Renner ve Weibel, 2011).

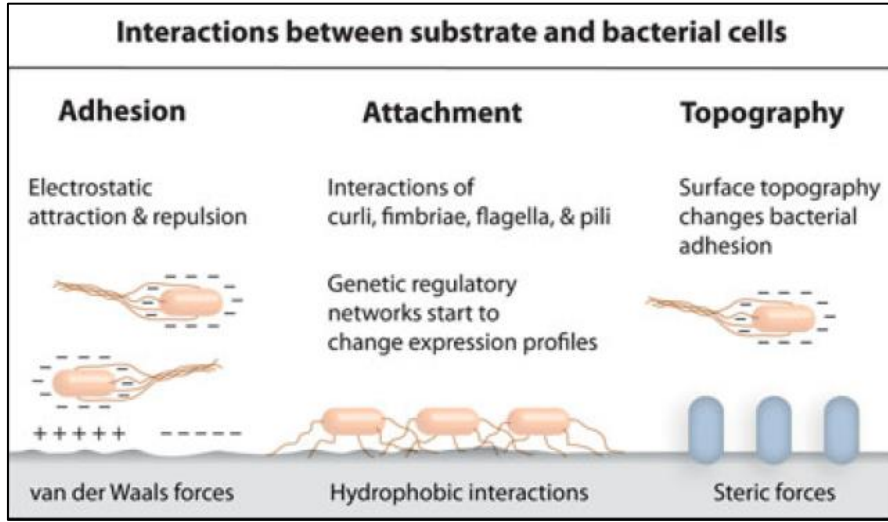
2.2.1. Bakterilerde geri dönüşümlü tutunma

Geri dönüşümlü tutunma, bakteri hücreleri ile yüzey arasında zayıf etkileşimlerle gerçekleştirilmektedir ve tutunma kuvvetlerin zayıf olması nedeniyle bakteri hücresi ile yüzey arasındaki bağ kolayca bozulabilmektedir. Bu zayıf tutunma genellikle hidrofobik etkileşimler, elektrostatik güçler ve van der Waals etkileşimlerinden oluşur. Yüzeyin fiziksel ve kimyasal özellikleri, bakterilerin tutunma yeteneklerini etkileyen önemli faktörlerdir (Vigeant, Ford, Wagner ve Tamm, 2002).

Hücreler, çevresel faktörlere göre biyofilm oluşturup oluşturmayacağına veya mevcut biyofilminden ayrılıp ayrılmayacağına karar verir. İkinci haberciler olarak adlandırılan moleküller, çevresel faktörlerin hücre içi yanıtlarını düzenleyen sinyal molekülleridir (O'Toole, 2000; Toyofuku, 2016). Geri dönüşümlü tutunmada, bakteri hücresi ile yüzey arasında zayıf etkileşimler nedeniyle tam bir tutunma olmaz, olumsuz çevresel koşulları sinyali alındığında bağlar kolayca kırılabilir.

2.2.2. Bakterilerde geri dönüşümsüz tutunma

Bakteri hücreleri, uygun bir yüzey bulduklarında, yaşamlarını devam ettirebilmek için besine ihtiyaçları vardır ve bulduktan sonra geri dönüşümsüz bağlardan dipol-dipol etkileşimleri, kovalent bağlar, hidrojen bağları gibi güçlü bağlarla yüzeye tutunarak biyofilm oluştururlar (Vigeant, Ford, Wagner ve Tamm, 2002). Yüzeye tutunan bakteriler, oluşturdukları ince EPS tabakası ile yüzeye tutunma kuvvetlerini artırır, çevresel stres, UV ışınları, antibiyotikler ve konak immünitesinden korunurlar.



Şekil 2.1. Yüzey ve bakteri arasında oluşabilecek bağ türleri (Renner ve Weibel, 2011)

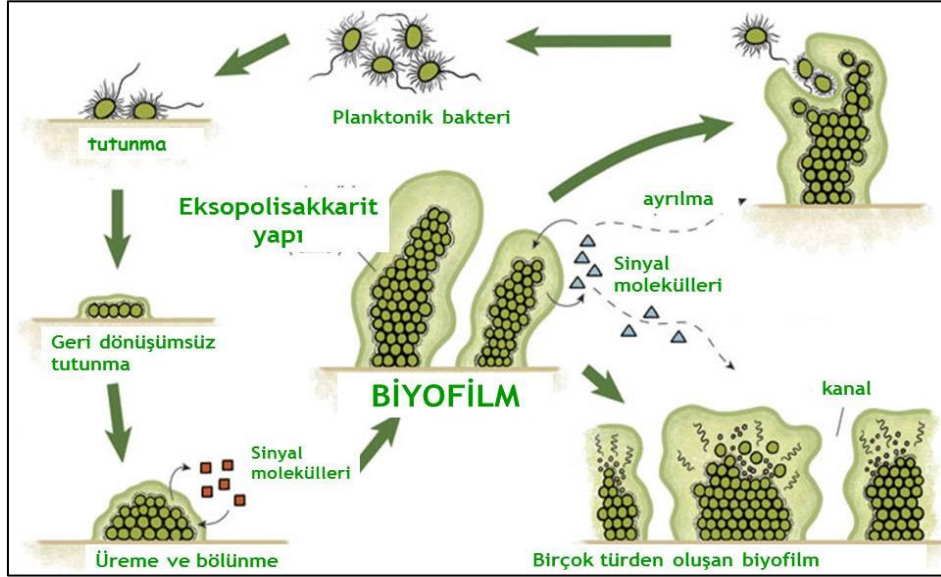
2.2.3. Üreme ve bölünme

Uygun koşullar ve yeterli besini sağladıktan sonra biyofilm içinde hızla çoğalan bakteriler, EPS matrisi içinde hareket ederek koloniler oluştururlar, bazı bakteriler çevredeki besin maddelerini alırken, diğerleri metabolik atıkları temizler ve bu sayede biyofilm içindeki bakteri popülasyonunun dengesini sağlar, biyofilm tabakasının büyümesini destekler. Biyofilm oluşturan bakteriler, çoğalma ve büyüme sürecinde biyofilm matrisi için ekzopolisakkaritler gibi matriks bileşenleri üretmeye devam ederler. Bu şekilde, biyofilm tabakasının yapısal bütünlüğünü korur, bakterilerin bir arada kalmasını sağlar ve biyofilm tabakasının dayanıklılığını artırır (Johnson, 2008).

2.2.4. Ayrılma

Biyofilm yapısındaki bakteriler, farklı bölgelerde yeniden kolonize olmak için yapıdan ayrılabilirler. Bu ayrılma, çeşitli dış ve iç etkenler tarafından kontrol edilmektedir. Dış etkenlerden olan hidrodinamik kuvvetler, biyofilm tabakasının üzerindeki akışkan hareketinden kaynaklanan kuvvetlerdir. Akışkanın hızı ve yoğunluğu, biyofilm tabakasının stabilitesini etkiler ve ayrılma sürecini hızlandırabilir. Yüzey gerilimi de, biyofilm tabakasının yüzeyine uygulanan bir kuvvettir ve biyofilm tabakasının dayanıklılığını etkileyebilir. Yine biyofilm yüzeyine etki eden rüzgar, akarsu vb. su kaynaklarında görülen akıntılar veya dalgalar biyofilm tabakasını parçalayabilir ve bakterilerin yüzeyden ayrılmasına neden olabilir. Genel olarak ayrılma süreçleri, biyofilm yapısının sürekli olarak yenilenmesini sağlar, hücrelerin farklı yüzeylerde yeniden biyofilm yapısı oluşturmaya

olarak tanır. Enzimatik sorunlar veya yüzeye bağlanmayı sağlayan proteinlerin yapısında meydana gelen bozulmalar gibi iç etkenler, biyofilm yapısındaki bakterilerin ayrılma davranışını etkileyebilir ve bu süreçte rol oynayabilirler (Horn, 2003; Petrova, 2016).



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları (Benetton, X. D. 2007)

2.3. Hastane Enfeksiyonları ve Biyofilm

Biyofilmlerin hemen her yüzeyde gelişebilmesi insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının büyük bir çoğunluğunun solunum cihazları, kateterler (santral venöz, üriner), protez kalp kapakçıkları ve ortopedik cihazlar gibi vucüda implante edilen tıbbi cihazların yüzeyindeki patojenlerin kolonizasyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Dufour, Leung ve Lévesque, 2010). Hastane enfeksiyonu etkeni olan bakteriler, kateterin dış yüzeyleriyle taşınarak veya sağlık çalışanları tarafından manipüle edilirken kateterden girerek, intravasküler kateterlerin enfeksiyonuna neden olabilmektedir. Gram pozitif mikroorganizmalardan *S. aureus*; üretral kateter, intravasküler kateter gibi biyomedikal cihazlarla ilişkili enfeksiyonlarda çok yaygın görülen türlerdendir (Otto, 2008; Tamilvanan, 2008). *S. epidermidis*, nozokomiyal enfeksiyonlarda kronik olma eğilimindeyken, *S. aureus* konakta akut bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarması nedeniyle akut enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (Otto, 2008). Stafilokoklar ve enterokokların sık görülen vakalardan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Stafilokoklar ve enterokoklar; deri, üst solunum yolu, alt gastrointestinal sistem ve ürogenital sistem insan florasının komensal üyeleridir. Bu nedenle implante tıbbi cihazlarda kolonize olma olasılığı en yüksek

organizmalar arasında olduğu bildirilmiştir (CDC, 1993; CDC, 2010; Erdemir, Polater ve Çırlak, 2011). *E. faecalis* en yaygın bakteriyel biyofilm etkenlerinden biri olup enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ında etken tür olduğu bildirilmiştir (Jett, 1994; Jones, 2004; Mohamed, 2007). Enterokoklar sağlık çalışanlarının elleri aracılığıyla ve hastadan hastaya bulaşı yoğun bakım ünitelerinde en sık rastlanılan enfeksiyonların etkenleri arasındadır (Boyce ve diğerleri, 1994).

Biyofilm kaynaklı antibiyotik direnci, kronik enfeksiyon tedavisinde önemli bir sorun haline gelmiştir (Gebreyohannes, 2019; Pai, 2023; Zaph, 2010). Biyofilm oluşumu sonucu gelişen kronik ve akut enfeksiyonların tedavisinde farklı stratejilerin geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Davies, 2003; del Pozo 2007; Schilcher, 2020; Thaarup, 2021).

Biyofilm oluşumunun engellenmesi için gerekli önlemler alınmalıdır. Mikroorganizmaların tutunabileceği, hücre yapısında bulunan nükleik asitler (DNA ve RNA), proteinler ve lipitler gibi organik bileşiklerin yıkama ile uzaklaştırılması ve etkili dezenfeksiyon uygulamaları önemlidir (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların artan görülme sıklığı nedeniyle biyofilm oluşumunun kontrolü ve önlemi için araştırmacılar yoğun çaba göstermektedir (Özçelik, 2010; Pfaller, 2009; Piras, 2013).

2.4. Anti-Biyofilm Aktiviteleri

Biyofilm içerisinde yer alan bakteriler gerek konakta gerek bağlandıkları yüzeyde tek hücreli formdan biyofilm durumuna geçişlerinde daha baskın yaşam tarzına geçişleri karmaşık faktörlere bağlıdır. Bu aşamalarda farklı bileşenler ile farklı konsantrasyonlarda antibiyofilm aktivite için araştırmalar mevcuttur (Manner, Skogman, Goeres, Vuorela ve Fallarero, 2013).

2.4.1. Bakteriyel iletişim (çevreyi algılama= quorum sensing) inhibisyon aktivitesi

Bakteriyel iletişimde (QS) sinyal bileşeni N-asil homo-serin laktonları (AHL) bakteri popülasyon yoğunluğunu ve hareketliliğini kontrol eder. Bu iletişimi, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde kontrol eden aktivatör proteinler olan LuxI, LuxR ve benzerleri veya sinyal molekülleri (Autoinducer; AI-1,AI-2) hedef alınarak biyofilm oluşum süreçlerinde yer alan bu iletişimin engellenmesine yönelik birçok sentetik ve doğal kaynaklı bileşenlerin antibiyofilm aktivite araştırması günümüzde sürdürülmektedir (Gopu, Meena ve Shetty,

2015). Yapılan araştırmalar, hücresel iletişimi engelleyerek bakteriyel iletişimin engellenmesi sonucu kolonizasyonun önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda furanon bileşiği yapısal benzerliği ile AHL antagonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Givskov, 1996; Manefield, 1999). Bu çalışmalarda patojenin yok edilmesi yerine bakteriyel virölansın attenüe edilmesi hedeflenmiştir. Araştırmacılar furanon bileşiğinin *P. aeruginosa*'da hücresel iletişimi engelleyerek QSC (Quorum Sensing Controlled) gen ekspresyonunu azalttığını ancak bakterilerin gelişmesine etkisinin olmadığını raporlamışlardır (Hentzer ve diğerleri, 2002). Araştırmacılar bitkisel bileşenlerden izole edilmiş kuersetinin bakterileri çevresel faktörlerden koruyan EPS üretimini azalttığı ve *S. aureus*'a karşı anti-biyofilm aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Manner, Skogman, Goeres, Vuorela ve Fallarero, 2013).

2.4.2. Stres yanıt yolağının hedef alınması

Araştırmacılar biyofilm gelişmesinde sinyal molekölü olan ve hücresel stres cevabı oluşturan guanosine 59-diphosphate 39-diphosphate ((p)ppGpp)'i inhibisyon amacıyla izole ettikleri 1018-peptitin antibiyofilm aktivitesini Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı 2,5-10 µg/mL konsantrasyonda biyofilm akış hücresi aparatında tespit etmişlerdir (De la Fuente-Núñez, 2014). Başka bir araştırmada ise 1018-peptidinin antibiyotiklerle sinerjistik etkiler gösterdiği de bildirilmiştir (Reffuveille, De La Fuente-Núñez, Mansour ve Hancock, 2014). De La Fuente-Nunez ve diğerleri (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 1038-peptiti gibi diğer peptitlerin de antibiyofilm etkin oldukları rapor edilmiştir.

2.4.3. Ekstraselüler polisakkarit matriksin enzimler aracılığıyla dağıtılması

Antibiyofilm etkinlikte EPS'nin yapısını bozan Polisakkarid liyazlar, DNaz I ve Dispersin B gibi enzimler, biyofilm içindeki mikroorganizmaları hedef almak için sık kullanılmaktadır (Itoh, 2005; Whitchurch, 2002). DNaz I enzimi, biyofilm yapısında bulunan e-DNA'yı parçalayarak; Dispersin B enzimi ise, bakterilerin bir araya gelmesini sağlayan β 1-6 N-asetilglukosamin (PNAG) polimerlerini keserek antibiyofilm aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kaplan, 2009). Araştırmacılar bu enzimlerin, antimikrobiyaller ile sinerjistik etki göstererek antibiyofilm aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Darouiche, Mansouri, Gawande ve Madhyastha, 2009).

2.4.4. Peptidoglikan tabakanın hedef alınması

Araştırmacılar, N-asetil muramik asit (NAMA) ile N-asetil glukozamin (NAGA) arasındaki β -1,4 glikozidik bağın parçalanmasını katalize eden lizozim benzeri enzimlerden olan tanenik asit gibi bileşiklerin, peptidoglikanı parçalayan enzimleri aktive ederek antibiyofilm aktivite gösterdiği bildirmiştir (Payne, 2013; Höltje, 1975; Shah, 2008).

Bakteri hücrelerinin duvarını parçalayan streptokok bakteriyofaj endolizini olan PlyC gibi özel enzimlerin biyofilm oluşumunu bozarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Hoopes, 2009; Shen, 2013). Bir başka araştırmada ise epigallocatechin gallate gibi bazı moleküllerin, hücre duvarını hedef alarak biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Yoda, 2004; Zhao, 2002).

2.4.5. Lipopolisakkarit çözünmesi veya nötralizasyonunun hedef alınması

Doğal moleküllerden oluşan mikroorganizmalar tarafından da üretilen antimikrobiyal peptitlerin (AMP) antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir. Genellikle pozitif yüklüdür hem hidrofilik hem de hidrofobik uçlara sahiptir bu sayede lipid tabakaya nüfuz edebilmekte ve suda çözünmektedir (Zhang ve Gallo, 2016). Antimikrobiyal peptitler, lipopolisakkaritler (LPS) ile etkileşime girerek hücre zarının bütünlüğünü bozduğu, diğer bir peptit olan PTP-7 ise pH veya yüksek metal iyon konsantrasyonlarından etkilenmediği böylece biyofilm yapısına etki ettiği bildirilmiştir (Kharidia ve Liang, 2011). Sushi peptitlerinin ise LPS'yi nötralize ederek anti-biyofilm aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Li, Wohland, Ho ve Ding, 2004).

2.4.6. C-di-GMP sinyal sisteminin hedef alınması

Planktonik bakteriler genellikle akut enfeksiyonlardan sorumludur ve antibiyotiklere duyarlıdır ancak biyofilm içerisindeki bakteriler kronik enfeksiyonlara neden olur ve antibiyotiklerle tedavisi zordur.

Biyofilm oluşumunda rol oynayan 3'-5'-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), ikincil habercidir ve sinyal yollarının değiştirilmesi sonucu antibiyofilm etki oluşturur (Römling, Galperin ve Gomelsky, 2013). Yapılan araştırmalarda sentezlenen

bileşiklerde c-di-GMP sentezini engelleyerek biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Wu, 2015; Sambanthamoorthy, 2014; Lieberman, 2014). Bakteriyel sinyal yollarından biri olan indol sinyalleşmesinin belirli moleküllerle inhibe edilerek biyofilm oluşumunu engellendiği bildirmiştir (Nishino, Nikaido ve Yamaguchi, 2007).

2.4.7. Biyofilm tabakanın hedef alınması

Bakterilerin hücre dışına salgıladıkları proteazlar (sarA, sigB, Esp) ve DNazlar gibi enzimlerin biyofilm içerisinde yer aldığı rapor edilmiştir (Beenken, 2010; Lauderdale, 2009; Tsang, 2008). Yapılan başka bir araştırmada ise bu enzimlerden ekstraselüler proteazların biyofilm matriksinin bileşenlerini parçaladığı, nükleazların ise, e-DNA'yı parçalayarak biyofilmin parçalanmasını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (Mann ve diğerleri, 2009). Bakterilerde yardımcı gen düzenleme (accessory gene regulatory: agr) sisteminin, biyofilm matriksini parçalayan enzimlerin sentezini kontrol ettiği bildirilmiştir (Boles ve Horswill, 2008).

Amiloid benzeri lifler ve TasA proteininin salgılanmasının da biyofilm oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (Branda, 2006; Romero, 2011). Moleküllerin anti-amiloid aktivitelerini test etmek için yapılan bir araştırmada *E. coli*, *Bacillus cereus* ve *B. subtilis* biyofilminde AA-861 ve parthenolide gibi inhibe edici moleküllerin, amiloid oluşumunu bozduğu bu sayede biyofilm parçalanmasına yol açtığı bildirilmiştir (Romero ve Kolter, 2011).

2.4.8. Adhezyon molekülü sentezi ve fonksiyonunun hedef alınması

Pili veya fimbrialar gibi hücresel uzantılar bakterilerin konak dokulara yapışmasını sağlayan uzun filamentli yüzey yapılarıdır ve biyofilm oluşumunda da rol almaktadır (Jacobsen, Stickler, Mobley ve Shirtliff, 2008). Antimikrobiyal peptitlerin bakterilerin yapışmasını etkileyerek biyofilm oluşumunun azalmasına yol açtığı rapor edilmiştir (Segev-Zarko, Saar-Dover, Brumfeld, Mangoni ve Shai, 2015). *Streptococcus bovis*'in ürettiği Bovicin HC5 ve nisin gibi bakteriyosinlerin, *S. aureus*'un tutunduğu yüzeylere yapışmasını en aza indirdiği bildirilmiştir (de Jesus Pimentel-Filho, de Freitas Martins, Nogueira, Mantovani ve Vanetti, 2014). Katyonik peptit LL-37'nin bakteri yapışmasını azalttığı bildirilmiştir (Overhage, 2008; Hell, 2010). Buforin II ve PR-39 nükleik asitlerle doğrudan etkileşen antimikrobiyal

peptitlerdendir (Cho, 2009; Boman, 1993). Melimine peptiti ve citropinin anti-biyofilm aktivite gösterdiği bildirmiştir (Cirioni, 2006; Willcox, 2008).

2.4.9. Membran geçirgenliğinin hedef alınması

Membran geçirgenliğinin bozulması birkaç farklı mekanizma ile sitoplazmik zarın bozulmasına neden olur (Mihajlovic, 2010; Gottler, 2009; Shai, 2001). Membran geçirgenliğini değiştirerek enzim üretimini engelleyen Lantibiyotik peptitlerden olan nisinin hücre duvarı sentezini inhibe ettiği ve membranda porlar açarak sitoplazmik membran geçirgenliğini arttırdığı bildirilmiştir (Hasper, 2006; Hsu, 2004; Bierbaum, 2009). Yapısal benzerliği olan subtilinin, epidermin ve galiderminin de biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Parisot, 2008; Saising, 2012).

2.5. Anti-Biyofilm Aktivite Yöntemleri

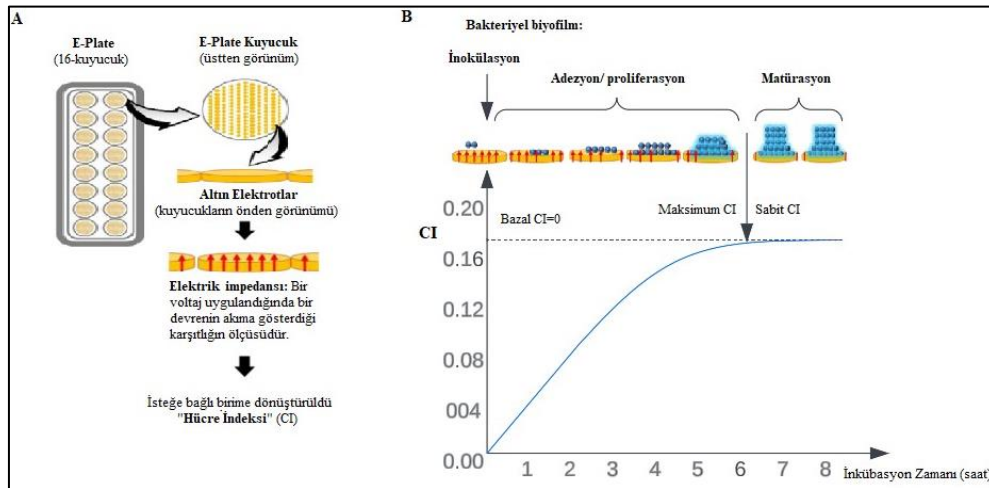
Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle birlikte biyofilm oluşumunu saptamada *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerden yararlanılmaktadır. Deney hayvanlarında biyofilm enfeksiyon modeli oluşturulmasına dayalı *in vivo* yöntemler sık kullanılmaktadır. Tüp testi yöntemi (Christensen yöntemi), mikropate kullanılan yöntemler, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), Kongo kırmızılı agar yöntemi, biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemlerdir. Kuru ağırlık ve metabolik aktivitenin saptanmasına dayalı bazı kantitatif yöntemlerle floresan mikroskopisi, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve elektron mikroskopisinin kullanıldığı yöntemler de bulunmaktadır (Atshan, 2012; Öztürk, 2014).

Biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri arasında hala en yaygın kullanılan Christensen ve arkadaşları tarafından 1982 ve 1985 yılları arasında geliştirilen kültür tüpünü kaplayan bakteriyel biyofilmin katyonik bir boya ile boyandığı tüp testi yöntemidir. Diğer yaygın bir yöntem boyanmış bakteri filminin optik dansitesinin (OD), spektrofotometrik olarak belirlendiği bir mikropata testidir (Christensen ve diğerleri, 1985).

Uygulanan tüm yöntemlerde araştırılan madde ve mikroorganizma özelliklerine göre inokulum miktarı, besiyeri, inkübasyon koşulları değişebilmektedir dolayısıyla

uygulanmada modifikasyonlar yapılmakta ve yöntemlerin standardizasyonu zorlaşmaktadır (Temel ve Erač, 2018).

Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (real time cell analyzer-RTCA) yöntemi hızlı ve güvenilir sonuçlar veren kolay bir yöntemdir. Bu yöntem başlangıçta, 96 kuyucuklu mikropalaklara eşdeğer bir yüzeye sahip olan E-plakaların, tabanına yerleştirilen altın mikroelektrotlar üzerine yapışan ökaryotik hücrelerin adhezyonu ve büyümesiyle oluşan elektrik akımına karşı direnci tespit etmek için geliştirilmiştir. Dirençteki bu değişim hücre sayısı ve biyofilm oluşumu ile orantılıdır (Valdes, Gueimonde ve Ruas-Madiedo 2015). Klasik yöntemlerle uyumlu olduğu belirtilen yöntemin biyofilm oluşumunu gerçek zamanlı gösterebilen ve maddelerin anti-biyofilm aktivitesinin değerlendirildiği yöntemdir (Gutiérrez, Hidalgo-Cantabrana, Rodríguez, García ve Ruas-Madiedo, 2016). İnokülasyon aşamasında elektrik akımına gösterilen dirençteki ölçüm ile hesaplanan hücre indeksi (CI) değeri "0"’dır. Bakteriler E-plate tabanında mikroelektrotlara adheze olduktan sonra başladıkları proliferasyon hızına bağlı olarak elektrik akımına gösterilen dirençte değişiklik yani CI değeri artışı görülmekte, akımın geçişine karşı direnç sabitlendiğinde maksimum CI’ya ulaşılmış yani mikroelektrot yüzeyi biyofilm tarafından tamamen kaplanmış olmaktadır. Maksimum CI değeri, biyofilmin olgunlaşma süresi boyunca sabitdir biyofilm ayrılma aşamasına geldiğinde CI değeri de orantılı olarak azalma görülür (Şekil 2.3.).



Şekil 2.4. Bakteriye biyofilm oluşumunun real time cell analyzer-RTCA gerçek zamanlı grafiği. A: standart E-plate (16-kuyu) de yer alan altın mikroelektrotlarla kaplanmış kuyucuklar. B: bakteriye biyofilm oluşumunda zamana karşı elektrik akımına gösterilen direnç

Prensip olarak Gerçek Zamanlı Hücre Analizine benzeyen bir diğer yöntem biyofilm gelişimini yine gerçek zamanlı izlemeyi sağlayan fiber-optik sensörlerin kullanılmasıdır (Orii ve diğerleri 2017). Birçok araştırmacı grubu bu yöntemin farklı modifikasyonlarını araştırmışlardır (Fischer, 2012; Philip-Chandy, 2000; Zhong, 2014). Yapılan bir araştırmada %1 maya ekstraktı ve glikoz içeren besin çözeltisinde biyofilm oluşumunu izlemek için bir fiber optik sensör geliştirilmiştir. Yöntemde 590 nm dalga boyuna optimize edilmiş bir beyaz ışık kaynağı ve spektral Vis-NIR aralığında bir spektroskopi dedektörü kullanılarak optik geçirgenliğin incelenmesine dayanmaktadır. Araştırmacılar, fiber-optik çekirdek yüzeyindeki biyofilm oluşumuna bağlı olarak, tabakanın kalınlığı arttıkça geçirgenliğin (transmitans) azaldığını VR sensörün anti-biyofilm aktivitesi araştırılan bir ürün için başarıyla kullanıldığını bildirmişlerdir (Orii ve diğerleri 2017). Yine fiber optik teknolojisiyle yapılan bir çalışmada fiber optik sensör su kanallarının kirliliğini anlık olarak tespit etmek için kullanılmıştır. Kapalı su sistemlerinde fiber-optik sensör üzerindeki biyofilm birikimine bağlı olarak kırılma indisindeki (refraktif indeks) artışı hesaplayarak biyofilm gelişiminin izlenebileceği bildirmişlerdir (Philip-Chandy ve diğerleri, 2000).

2.6. Bakteriyel Direnç

Araştırmacılar genelde bakteriyel direnci, doğal (intrinsik) direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere iki temel türe ayırmaktadır (Schwarz ve Chaslus-Dancla, 2001).

2.6.1. Doğal (intrinsik) direnç

Bakterilerin tür özelliği olarak ilacın hedef aldığı yapıyı taşımamalarına veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasına doğal (intrinsik) direnç denmektedir. Enterokoklar gibi bazı bakteriler, dışardan aldığı folatları kullanabilirler yani kendi folat sentez yollarına bağımlı değildirler bu sayede enterokoklar, trimetoprim ve sülfonamid gibi folat yolağını hedef alan antibiyotiklere karşı doğal olarak dirençlidirler (Schwarz, Loeffler ve Kadlec, 2017). Vankomisin, Gram negatif bakterilerin dış zarına penetre olamaz bu sayede *P. aeruginosa* gibi bakteriler vankomisine karşı doğal dirençli olmasıdır (Van Duijkeren, Schink, Roberts, Wang ve Schwarz, 2018).

2.6.2. Kazanılmış direnç

Kazanılmış direnç bakteri suşunun, bir antimikrobiyale karşı bir mutasyon veya genetik değişiklik ile direnç kazanabilmesidir. Örneğin *S. aureus*, metisilin ile tedavi edildiğinde, bazı suşlarda metisiline karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu durumda, bu bakteri suşu "metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*" (MRSA) olarak adlandırılmaktadır. Kazanılmış dirençte genellikle değişiklik, kromozomal DNA'da hücrede belirli bir işlevden sorumlu olan gende olmaktadır. Örneğin bakteride ilacın bağlandığı reseptörün yapısı değişebilmektedir veya yeni bir reseptör oluşturulabilmektedir. Kromozomal mutasyonla gelişen direnç başka bakterilere yayılmamaktadır ve mutasyona uğrayan bakterinin metabolik aktivitesi de değişebilmektedir bunun sonucu olarak bakterinin üreme yeteneği de azalabileceğinden plazmidle oluşan dirence göre daha seyrek görülmektedir.

Direnç kazanma yöntemlerinde biri üzerinde ilaçlara karşı direnç genlerini taşıyan direnç yapıları (plazmidler, transpozonlar, insersiyon dizileri) aktarıldıkları mikroorganizmaya bir veya birden çok antimikrobiyale karşı dirençli olma özelliğini kazandırmaktadırlar. Bakterilerde gen aktarım yolları olan transdüksiyon, konjugasyon ve transpozon ile direnç plazmidleri taşınarak diğer bakterilere aktarılmaktadır.

2.6.3. Kazanılmış direnç mekanizmaları

İlaç hedefinde değişiklik olması

Mikroorganizma üzerinde ilacın hedeflediği yapıda gerçekleşen değişimler birkaç farklı mekanizmayla ilacın etkisini azaltabilmektedir. Örneğin bakteri hücre zarında bulunan penisilin bağlayan proteinlerde değişim görülebilmektedir bu da β -laktam grubu içeren antibiyotiklere karşı direnç sağlamaktadır. Başka bir mekanizma ise bakterilerin, antibiyotiğin hedef aldığı ribozom yapısında değişiklikler yaparak antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmesidir örneğin *Mycobacterium tuberculosis*, antibiyotiklerin ribozomlara bağlanmasını engelleyerek direnç geliştirebilmektedir. Bakteriler özellikle makrolit, aminoglikozit ve linkozamitlerde bu mekanizma direnç geliştirilmektedir. Enzimatik hedeflerde de değişim görülebilmektedir böylece sulfonamid, trimetoprim, rifampin ve kinolonlara karşı direnç sağlamaktadır.

Sentezlenen enzimle ilacın inaktive veya modifiye edilmesi

Bakteriler, antibiyotiği etkisiz hale getiren enzimler üretebilmektedirler örneğin β -laktam antibiyotiklerin birçoğu, hücre duvarını sentezleyen bakteriyal enzimlerin çalışmasını engelleyerek bakteri hücrelerinin büyümesini durdurmakta veya öldürmektedir. β -laktamaz enzimleri, β -laktam türü antibiyotiklerin içerdiği β -laktam halkasını parçalayarak etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. *S. aureus* ve *E. coli* gibi birçok bakteri türü, β -laktamaz enzimlerini üretebilmektedir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, β -laktamaz enzimlerini üreterek penisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklerine karşı direnç geliştirebilmektedir.

Hücreye giren veya biriken ilaç miktarının azalması

Bakteriler birkaç farklı mekanizma ile hücre içerisinde ilaç konsantrasyonunun artmasını engelleyerek antibiyotiklere karşı direnç gösterebilmektedir. Mekanizmalar; bakterinin permeabiliteyi azaltması, antibiyotik alım ve transport sisteminin zayıflatılması veya efflux pompalama ile ilacın dışarı atılması olarak sıralanabilir. Birçok bakteri türü, özellikle gram-negatif bakteriler, efflux pompalarına sahiptir. *P. aeruginosa* geniş bir yelpazedeki antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte etkili olan çeşitli efflux pompalarına sahiptir.

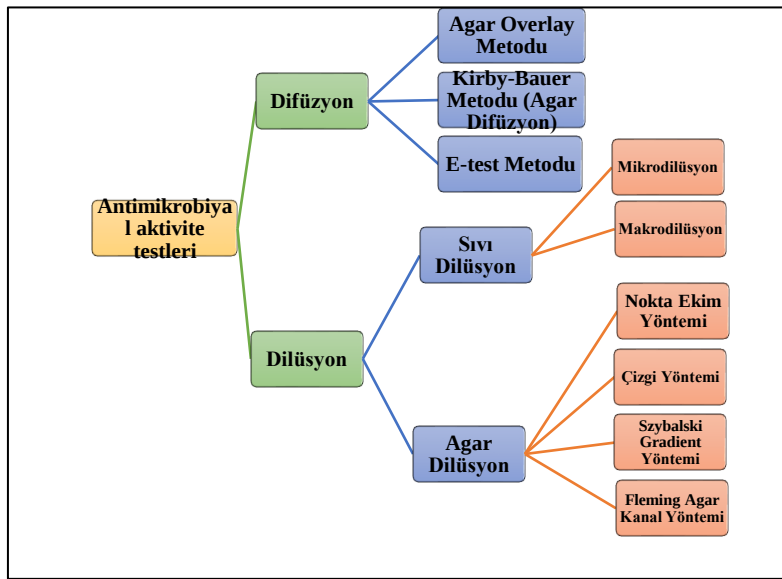
Metabolik aktivite azaltılması veya değiştirilmesi

Örnek olarak, *E. coli* gibi bakteriler antibiyotik stresine yanıt olarak metabolik aktivitelerini azaltır, enerji ve kaynaklarını antibiyotiğe direnç göstermek için harcayabilmektedirler.

2.7. Antimikrobiyal Aktivite Testi Yöntemleri

Antimikrobiyal aktivite testleri etken madde keşfi, epidemiyoloji ve terapötik doz aralığı belirlemek için kullanılır. Tüm önemli antibiyotik gruplarının (penisilinler, sefalosporinler, makrolidler, tetrasiklinler, aminoglikozitler ve sülfonamidler) keşfedildiği ve kemoterapinin temel sorunlarının çözüldüğü altın çağından sonra mikrobiyal direncin artması nedeniyle ilaçlar antimikrobiyal aktivitesini kaybetme tehlikesiyle karşı karşıyadır (Mayers, Sobel, Ouellette, Kaye ve Marchaim, 2017).

Bir bitkisel ekstrenin veya kimyasal bileşiğin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemleri difüzyon ve dilüsyon yöntemleridir. Antimikrobiyal aktivite testlerinin en temel ve en bilinenleri disk-difüzyon, sıvı veya agar dilüsyon yöntemleridir. Bu yöntemler, antimikrobiyal aktivitenin zaman ve konsantrasyona bağlı olarak bakterisidal veya bakteristatik etkisini ve mikroorganizmaya karşı hücresel hasarın (hücre ölümü, fonksiyonların kaybı veya hücrenin yapısının bozulması) derecesini belirleme konusunda bilgi verir. Antimikrobiyal aktivite test yöntemleri uygulanan prensibe dayalı olarak, çeşitli tiplere ayrılmıştır:



Şekil 2.5. Uygulama prensiplerine göre antimikrobiyal aktivite test yöntemleri

2.7.1. Difüzyon yöntemleri

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotik aktivitenin değerlendirilmesinde difüzyon testleri en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Kirby-Bauer yöntemi CLSI ve FDA tarafından önerilen yöntemlerdendir. Testin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği, standart prosedürde kullanılan malzemelerin steril muhafaza edilmesine bağlıdır. Bu test, incelenen mikroorganizmanın kâğıt disklere emdirilen antibiyotiğe duyarlılığını belirlemek için kullanıldığı bir yöntemeye dayanır. Kullanılan kâğıdın emme ve emdiği maddeyi difüze etme yeteneği yöntemin doğruluğu için çok önemlidir. Belirlenen miktarda antibiyotik içeren kâğıt diskler, yoğun ekim yapılan katı besiyerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra agar üzerinden difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. 24 saat 35°C'de yapılan inkübasyon süresinin ardından, ilacın inhibitör konsantrasyonlarının elde

edildiği disk zonunda üreme gözlemlenmez. Mikroorganizmanın ilaca duyarlılığı arttıkça, disk etrafında oluşan inhibisyon zonu genişler. İnhibisyon zon çapı milimetre olarak ölçülür ve CLSI tarafından belirlenen referans değerler ile karşılaştırılarak yorum yapılır (CLSI M02-A11, 2012: 1–58; European Committee on antimicrobial susceptibility testing [EUCAST], 2013: 1–18).

2.7.2. Dilüsyon yöntemleri

Sıvı ve katı besiyerlerde dilüsyon yöntemleri, antimikrobiyal maddelerin bakterilere karşı laboratuvar koşullarında aktivitesini kantitatif olarak ölçmeye yarar. Temel olarak, bir seri tüpe veya mikropleyte sıvı besiyeri agar dilüsyonda ise petriye katı besiyeri konur. Antimikrobiyal madde dilüsyonu yapılarak farklı konsantrasyonlarda eklenir. Bu besiyerlerine, standart miktarda mikroorganizma içeren bir süspansiyon inoküle edilir. Besiyerleri 24 saat 35°C'de inkübe edildikten sonra üremenin olmadığı en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak belirlenir (CLSI M07-A9, 2012: 1–67; Wiegand, 2008).

2.7.3. Dilüsyon ve difüzyon

Gradient Difüzyon Duyarlılık Testi, E-test veya Epsilometre testi olarak da adlandırılabilen, gradient ve stripler kullanılarak yapılan kantitatif bir yöntemdir. E-test *S. pneumoniae*, β -hemolitik streptokok, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus sp.* ve anaeroblar gibi zor üreyen organizmalar için MİK değerlerini belirlemek için kullanılabilir.

E-test yönteminde besiyerine numune inokule edildikten sonra strip agar yüzeyine konulur ve 24 saat 35°C'de inkübe edilir. İnkübasyondan sonra antimikrobiyal maddenin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu şeritler, agar yüzeyine yerleştirilir. Şeridin agar üzerine yerleştirilmesiyle antibiyotik, difüze olur. İnkübasyon sonrası simetrik bir inhibisyon elipsi oluşur. MİK değeri, şeridin üst yüzüne basılı olan doğrusal ölçekten ve üremenin inhibe olduğu zonun şeridi kestiği noktada okunur. Kalibre edilmiş strip ile inhibisyon alanının kenarının kesişimi, MİK değerini gösterir (Baker, 1991; Huang, 1992).

2.8. Biyoaktiviteleri Araştırılan Türkiye’de Yetişen Bitkiler

Ülkemizde Türkiye'nin kuzey kesimlerinde ve Anadolu'nun iç kesimlerinde yetişen *Echium vulgare* ve *Echium orientale*, kıyı kesimlerinde yetişen *Echium plantagineum* ve Marmara bölgelerinde yetişen *Phytolacca americana* türleri çalışmamıza dahil edilmiştir.

2.8.1. *Echium vulgare* (Engerek otu)



Alem: Plantae
 Altalem: Tracheobionta
 Bölüm: Magnoliophyta
 Sınıf: Magnoliopsida
 Takım: Boraginales
 Familya: Boraginaceae
 Genus: Echium
 Tür: Echium vulgare

Resim 2.1. *Echium vulgare*

Echium vulgare Türkiye’de “Engerek Otu” olarak bilinen boyu 90 santimetreye kadar uzayabilen, iki yıllık otsu bir bitkidir. *Echium vulgare*’nin yaprak veya gövdesine dokunulması dermatite neden olabilir. Bitkiye temas edilecekse eldiven giyilmelidir.

E. vulgare daha önceden farklı bitkilerden elde izole edilip antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış fenolik asitler (Ghasemzadeh A. ve Ghasemzadeh N. 2011), polisakkaritler (Tahmouzi, 2014), pirolizidin alkaloidleri (Wei, Ruan ve Vrieling, 2021), naftokinon pigmentleri (Sasaki, Abe ve Yoshizaki, 2002) ve organik asitler (Zare ve diğerleri, 2011) içermektedir.

E. vulgare ekstresinin antibakteriyel aktivitesi daha önceden bildirilmiştir. Yapılan bir araştırmada; *E. vulgare*’nin toprak üstü sulu ekstresinde; *S. epidermidis*, *S. marcescens* ve *E. cloacae*’ya karşı disk diffüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre 7 mm ile 8,2 mm zon çapında antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Karakaş, Yıldırım ve Türker, 2012).

2.8.2. *Echium plantagineum* (Kırkbatıran)



Alem: Plantae
 Altalem: Tracheobionta
 Bölüm: Magnoliophyta
 Sınıf: Magnoliopsida
 Takım: Boraginales
 Familya: Boraginaceae
 Genus: Echium
 Tür: *Echium plantagineum*

Resim 2.2. *Echium plantagineum* L.

Echium plantagineum L. Türkiye'de "Kırkbatıran" olarak bilinen yumuşak tüylere sahip, bir veya iki yıllık bir bitkidir. *E. plantagineum*'un yaygın olarak bildirilen kullanım şekli toprak üstü kısmının kaynatılıp çay ve tentür haline getirilmesidir. Elde edilen çayın diaforetik ve diüretik olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Sezik ve diğerleri, 1997: 195-211).

E. plantagineum daha önceden farklı bitkilerden elde izole edilip antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış bitki içerikleri olan; flavonoidler (Kumar ve Pandey, 2013), naftokinon pigmentleri (Sasaki ve diğerleri, 2002), pirolizin alkaloidleri ve organik asitler içermektedir (Zare ve diğerleri, 2011).

Echimidine ve Echihumiline, *E. plantagineum* türünde bulunan ana pirolizidin alkaloididir. Yapılan bir araştırmada Echimidine ve Echihumiline alkaloidlerinin anti-inflamatuar, analjezik, lokal anestezi ve anti-plasmodyum aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Debnath ve diğerleri, 2018).

E. plantagineum bitkisinin bir başka içeriği olan shikonin yara iyileştirici, anti-inflamatuar, antibakteriyel, anti-oksidan, anti-trombotik ve anti-tümör özelliklere sahip olduğu bildirilen doğal bir kırmızı naftokinon pigmentidir (Papageorgiou, Assimopoulou ve Ballis, 2008). *E. vulgare* ile karşılaştırıldığında, *E. plantagineum*'un kök ekstresinde yaklaşık 2,5 kat daha yüksek shikonin bulunduğu bildirilmiştir (Skoneczny ve diğerleri, 2015).

2.8.3. *Echium orientale* (Akşamşavkı)



Alem: Plantae
 Altalem: Tracheobionta
 Bölüm: Magnoliophyta
 Sınıf: Magnoliopsida
 Altsınıf:
 Takım: Boraginales
 Familya: Boraginaceae
 Genus: *Echium*
 Tür: *Echium orientale*

Resim 2.3. *Echium orientale*

Echium orientale Türkiye'de “Akşamşavkı” olarak bilinen *Echium orientale* L., Boraginaceae familyasına ait, Türkiye'nin kuzey kesiminde ve Anadolu'nun iç kesimlerinde görülen endemik bir bitkidir (Davis, 1970). Endemik olması bitkiyi değerli kılmaktadır.

Echium türlerinin, özellikle pirolizidin alkaloidleri, shikonin türevleri ve yağ asitleri olmak üzere ikincil metabolitler açısından zengin olduğu bildirilmiştir (Kuruüzüm-Uz, 2004; Mehrabani, 2005; Türker, 2018). Bitkinin sekonder metabolitlerinden biri fenolik asit türevi olan rosmarinik asittir. Rosmarinik asidin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu daha önceden bildirilmiştir (Petersen 2003; Vostalova, 2010).

Arzu Uçar Türker ve diğerleri (2018) *E. orientale* L. bitkisinde antibakteriyel aktiviteyi disk difüzyon yöntemiyle araştırdıkları çalışmalarında tarlada yetiştirilen yaprakların metanolik ekstralarının ($14,3 \pm 0,3$ mm) in vitro yetiştirilen yapraklara ($9,5 \pm 0,3$ mm) göre daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada sulu ekstre ile karşılaştırıldığında metanolik ekstrenin daha yüksek aktivite göstermesi, metanol ekstresindeki polifenollerin daha yüksek miktarlarıyla ilişkilendirilmiştir.

2.8.4. *Phytolacca americana* (Şekerci Boyası)



Alem: Plantae
 Altalem: Tracheobionta
 Bölüm: Magnoliophyta
 Sınıf: Magnoliopsida
 Takım: Caryophyllales
 Familya: Phytolaccaceae
 Genus: Phytolacca
 Tür: Phytolacca americana

Resim 2.4. *Phytolacca americana*

Phytolacca americana (Şekerci Boyası) Çiçeklenmenin Haziran-Eylül ayları arasında olduğu, yaşam alanları tarlalar, yamaçlar ve çalılık habitatlar olan bir bitkidir. Yangınlardan dahi etkilenmemesini sağlayan güçlü ve derin kök sistemi bulunmaktadır. Yangından sonra köklerinden yeniden büyüyerek yaşamına devam edebilmektedir. *P. americana* L. taksonunun zehirli olduğu için kullanımına dikkat edilmesi gerektiğiyle birlikte özellikle Çin’de tedavi, gıda ve hayvan yemi olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Bailly, 2021).

Phytolacca americana L’nin. antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanser ve uyarıcı etkilerinden dolayı Güney ve Orta Amerika’da geleneksel tıpta, birçok rahatsızlığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (Ravikiran, 2011; Ding, 2013).

P. americana L.’nin antimikrobiyal aktivitesi daha önceden bildirilmiştir. Ham ekstre ile yapılan bir çalışmada 1,8 mg/mL’de *Porphyromonas gingivalis*’e karşı oldukça aktif (%100 büyüme inhibisyonu) ve *S. mutans*’a karşı orta derecede (%44 büyüme inhibisyonu) aktif olduğu bildirilmiştir. (Patra ve diğerleri, 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Bitkisel Ekstreler

Araştırmada kullanılan *Echium* ve *Phytolacca* türleri Temmuz 2021'de Türkiye'nin farklı yerlerinden, doğal yaşam alanlarından toplanmıştır. *Echium plantagineum* L., *Echium vulgare* L. ve *Phytolacca americana* Kırklaraeli'nin Vize ilçesinden; *Echium orientale* L. Kütahya Domaniç-Tavşanlı yolundan toplanmıştır. Bitkilerin teşhisleri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Bölümü'nden Doç.Dr. M. Ufuk Özbek tarafından yapılmıştır. *E. plantagineum*, *E. orientale* ve *E. vulgare*'nin kanıt niteliğinde örnekleri sırasıyla GUE-3849, GUE-3850 ve GUE-3851 herbaryum erişim numarasıyla Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmıştır.

Araştırmamızda antimikrobiyal yönden incelenen ekstreler; *Echium vulgare*-MeOH (kök), *Echium vulgare*-MeOH (toprak üstü), *Echium plantagineum*-MeOH (kök), *Echium plantagineum*-MeOH (toprak üstü), *Echium orientale*-MeOH (kök), *Echium orientale*-MeOH (toprak üstü), *Phytolacca americana*-MeOH (Yaprak), *Phytolacca americana*-MeOH (Meyve) tıbbi bitkisel ekstre stok solüsyonları Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr. İpek SÜNTAR ve Dr. Kevser TABAN tarafından hazırlanmıştır.

3.2. Mikrobiyolojik Analiz

Araştırmamızda kullanılan mikroorganizmalar Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Kültür Koleksiyonundan sağlanmıştır.

3.2.1. Gereç ve yöntemler

Mikroorganizmalar

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Streptococcus mutans* ATCC 21752
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

- *Escherichia coli* ATCC25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145,
- *Klebsiella pneumoniae* RSKK574
- *Acinetobacter baumannii* RSKK02026
- *Candida albicans* ATCC10231
- *Candida parapsilosis* ATCC90028
- *Candida krusei* ATCC6258
- *Trycophyton rubrum* RSKK486
- *Epidermophyton floccosum* RSKK3027
- *Microsporum gypseum* NCPF580

Besiyerleri

- Muller Hinton Agar (MHA, Merck)
- Muller Hinton Broth (MHB, Merck)
- Saboroud Dekstroz Agar (SDA, Merck)
- Saboroud Liquid Medium (SLM, Merck).

Çözücüler

- Dimetilsülfoksit (DMSO, Merck)
- %80 metanol : %20 su
- Fosfat tampon çözeltisi
- Distile su

Kullanılan kontrol antimikrobiyal maddeler

- Ampisilin (AMP, sigma A0166)
- Levofloksasin (LFX, sigma D1806)
- Gentamisin (GM, sigma A8650)
- İtrakonazol (ITRA, sigma 16657)
- Griseofulvin (GRI, sigma G2664)
- Terbinafin (TER, sigma G003253)

- Ketokonazol (KET, sigma G003254)
- Flukanozol (FLU, sigma 48F8814)

Kontrol ajanlar; fosfat tamponu (AMP, pH: 8,0), su (GEN, LFX, FLU) ve %5 DMSO (KET, ITRA, GRI) ve %1 Tween 80 (TERB) çözücülerinde hazırlanarak deneyde test edilmiştir. Stok solüsyonlar CLSI kriterlerine göre hazırlanmıştır (CLSI M38-A2, 2008: 1–35; (CLSI M27-A3, 2012: 1–25).

Cam malzemeler

- Balon joje
- Beher
- Test tüpleri
- Petri kutuları
- Erlen
- Cam pipetler (1ml, 5ml, 10ml).

Cihazlar

- Güvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, ClassII A-B (1'2'3') III)
- ELİZA cihazı (Molecular Devices Versamax)
- Otoklav (Nüve, OT 4060, ISO, 9001)
- Pasteur fırını (NEL, NR900, Heraeus NR900)
- Vorteks (Fırlabo)
- Hassas terazi (AW320, D432410445, Shimadzu)
- pH metre (Appoyal)
- Otomatik pipetler (Greiner, eppendorf)

3.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Bakterisit/ fungusit ve bakteristatik/ fungustatik konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla MİK ve üstü dilüsyonlarında katı besiyerine ekim yapılarak değerlendirilmiş ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle kantitatif inhibisyon konsantrasyonları (IC₅₀) 600-690 nm absorbansta ELİZA mikroyok okuyucuda ölçüm yapılmıştır

3.3.1. İnokulum hazırlığı

Araştırmada; American Type Culture Collection (ATCC), Culture Collection of Refik Saydam Central Hygiene Institute, Refik Saydam Kültür Koleksiyonu (RSKK), National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF)'ye ait referans suşlar kullanılmıştır.

Dermatofitlerden; *T. rubrum* (RSKK 486) *E. floccosum* (RSKK 3027) ve *M. gypseum* (NCPF 580), miselyum ve konidia gelişimi için patates dextroz agara pasajlanmış ve 28°C'de 7–10 gün inkübe edilmiştir. Tüm dermatofit suşlar steril bir pastör pipeti yardımıyla 10 mL steril serum fizyolojik (%0,9) içerisine alınmış ve 15–20 dk ağır partiküllerin çökmesi için CLSI M38-A' da önerildiği biçimde oda ısısında bekletilmiştir.

Kültür süspansiyonları spektrofotometrik olarak OD₉₀ 520 nm' de %70–72 absorbansa göre hazırlanmıştır. Stok süspansiyonlar RPMI 1640+0,165 M MOPS (pH: 7,0) ile 1:50 oranında dilüe edilerek 4x10³ ve 5x10⁴ CFU/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum; antidermatofitik aktivite testinde denenmiştir.

Maya benzeri funguslardan *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C.krusei* SDA besiyerinde 35°C'de 24 saat üremiş kültürleri steril serum fizyolojik içerisine alınmıştır ve RPMI besiyeriyle 5x10² CFU/mL'de hazırlanmıştır.

Gram pozitif bakterilerden; *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, Gram negatif bakterilerden ise; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii*, MHA'da 37°C'de 1 gecelik kültürlerinden 0,5x10³ CFU/mL'de hazırlanmıştır.

3.3.2. Yöntem

Echium vulgare (kök), *Echium vulgare* (toprak üstü), *Echium plantagineum* (kök), *Echium plantagineum* (toprak üstü), *Echium orientale* (kök), *Echium orientale* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) 'nın metanol ekstraktları nihai konsantrasyonu 1024 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır ve 0,22 mm millipore (MA 01730, ABD) kullanılarak filtrasyon yoluyla sterilize edilmiştir ve stok çözeltiler olarak kullanılmıştır.

Standart antibakteriyel ve antifungal ilaçlar olarak ampisilin (AMP), gentamisin (GM), levofloksasin (LFX), flukonazol (FLU), ketokonazol (KET), terbinafin (TER), grizeofulvin

(GRI), itrakonazol (ITRA) kullanılmıştır. Referans antibakteriyel maddeler Sigma Chemical Co.'dan satın alınmıştır ve fosfat tampon çözeltisi (ampisilin, pH 8,0; 0,1 mol/mL), dimetilsülfoksit (ketokonazol, terbinafin, grizeofulvin, itrakonazol) veya su (gentamisin, levofloksasin, flukonazol) içinde çözülmüştür.

Antidermatofit, antifungal ve antibakteriyel aktivite tayininde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Besiyeri içeren 96 kuyulu mikropleyte maddelerin çift katlı dilüsyonları (128-0,125 µg/mL) yapılmıştır. Kuyulara her örnek için 10 µL dermatofit, maya benzeri fungus ve bakteri kültür süspansiyonu ilave edilerek sırasıyla; 28°C'de 72 saat, 35°C'de 24 saat, 37°C'de 18 saat inkübasyon sonrası minimum inhibisyon dilüsyonları (MİK) belirlenmiştir.

Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle besiyeri içeren 96 kuyulu mikropleyte maddelerin çift katlı dilüsyonları (128-0,125 µg/mL) yapılmıştır. Kuyulara her örnek için 10 µl dermatofit, maya benzeri fungus ve bakteri kültür süspansiyonu ilave edilmiştir. Resazurin solüsyonu 10 µl ilave edilmiştir. Dermatofitler için 28°C'de 72 saat, *Candida*'lar için 35°C'de 24 saat, bakteriler için 37°C'de 18 saat inkübasyon sonrası resazurinin metabolik aktivite sonunda resafurine dönüşerek oluşturduğu renk değişimi değerlendirilmiştir.

Bakterisit/ fungusit ve bakteristatik/ fungustatik konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla MİK ve üstü dilüsyonlarında katı besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda üreme görülmeyen örnekler bakterisit/fungusit, üreme görülenler bakteristatik/fungustatik olarak değerlendirilmiştir. Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile kantitatif %50 inhibisyon konsantrasyonlarının (IC₅₀) belirlenmesi amacıyla 600-690 nm absorbansta ELİZA mikropleyt okuyucu' da ölçüm yapılarak inhibisyon oranları denenen tüm mikroorganizmalar/test örnekleri ve konsantrasyonları için belirlenmiştir. Grafiklerin oluşturulması ve %inhibisyon değerleri (% İn.); $\% \text{İnh.} = \frac{[\text{Rezasurin} + \text{çözücü} + \text{besiyeri}] - [\text{Rezasurin} + \text{mikroorganizma} + \text{besiyeri}]}{[\text{Rezasurin} + \text{çözücü} + \text{besiyeri}]} \times 100$ değerlerine göre hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Gram pozitif mikroorganizmalardan *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* ve *E. faecalis* üzerinde denenilen *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; $\mu\text{g/mL}$), minimum bakteriyostatik/-sidal (MBS/-MBC; $\mu\text{g/mL}$) değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC_{50} ; $\mu\text{g/mL}$) değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *S. aureus*’a karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök) ve *P. americana* (yaprak) ekstrelerinde $64 \mu\text{g/mL}$ ’de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. *E. orientale* (topraküstü) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerindeyse mikrodilüsyon yönteminde $64 \mu\text{g/mL}$ ’ de antibakteriyel aktivite belirlenirken kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde $128 \mu\text{g/mL}$ ’ de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC_{50} ise; $28-41 \mu\text{g/mL}$ aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *S. mutans*’a karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök) ekstresinde $32 \mu\text{g/mL}$ ’de; *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (topraküstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinde $64 \mu\text{g/mL}$ ’de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC_{50} ise; $30-20 \mu\text{g/mL}$ aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *B. subtilis*’e karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök) ve *E. orientale* (kök) ekstrelerinde $64 \mu\text{g/mL}$ ’de; *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (topraküstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinde $32 \mu\text{g/mL}$ ’de, antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC_{50} ise; $18-58 \mu\text{g/mL}$ aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *E. faecalis*'e karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü) ve *E. plantagineum* (kök) ekstrelerinde 128 µg/mL'de; *E. orientale* (kök), *E. orientale* (topraküstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinde 64 µg/mL'de; *E. plantagineum* (toprak üstü) ekstresinde mikrodilüsyon yönteminde 64 µg/mL' de antimikrobiyal aktivite belirlenirken kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde 128 µg/mL' de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 31-62 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Gram negatif mikroorganizmalardan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* denen *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/mL), minimum bakteriyostatik/-sidal (MBS/-MBC) değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri Çizelge 4.2. de görülmektedir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *E. coli*'ye karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü) ve *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü) ve *E. orientale* (kök), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinde 64 µg/mL'de; *E. orientale* (topraküstü) ekstresinde 32 µg/mL' de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 28-35 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *P. aeruginosa*'ya karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök) ekstresinde 32 µg/mL' de; *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök) ve *E. orientale* (topraküstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinde 64 µg/mL'de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 17-40 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *K. pneumoniae* 'ya karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. orientale* (kök) ve *P. americana* (meyve) ekstresinde 64 µg/mL' de; *E. vulgare* (toprak üstü) ve *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü) ve *E. orientale* (topraküstü) ve *P. americana* (yaprak) ekstrelerinde 32 µg/mL'de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 22-37 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *A. baumannii*'ye karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü) ve *E. plantagineum* (kök) ekstrelerinde 128 µg/mL'de; *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (topraküstü) ve *P. americana* (yaprak) ekstrelerinde 32 µg/mL'de; *E. orientale* (kök) ve *P. americana* (meyve) ekstresinde 64 µg/mL' de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir MBS/MBC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 20-72 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Maya benzeri funguslardan *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* denen *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/mL), minimum fungistatik/-sidal (MFS/-MFC) değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri Çizelge 4.3.' de görülmektedir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *C. albicans*'a karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök) ve *E. plantagineum* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstrelerinde 64 µg/mL'de; *E. orientale* (topraküstü) ve *E. orientale* (kök) ekstrelerinde 128 µg/mL' de antifungal aktivite belirlenmiştir MFS/MFC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 31-70 µg/mL aralığındadır.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'ye karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök) ve *E.*

plantagineum (toprak üstü) ekstralarında 128 µg/mL’de; *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstralarında ise 256 µg/mL’de antifungal aktivite belirlenmiştir. MFS/MFC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; *C. parapsilosis* için 31-70 µg/mL, *C. krusei* içinse 55-93 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Dermatofitlerden *T. rubrum*, *E. floccosum* ve *M. gypseum* denen *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstralarının ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/mL), minimum fungistatik/-sidal (MFS/-MFC) değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri Çizelge 4.4. de verilmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *T. rubrum*’a karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök) ve *E. plantagineum* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstralarında 32 µg/mL’de; *E. orientale* (topraküstü) ve *E. orientale* (kök) ekstralarında 64 µg/mL’ de antifungal aktivite belirlenmiştir MFS/MFC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 16-28 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *E. floccosum*’a karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök) ve *E. plantagineum* (toprak üstü) ekstralarında 64 µg/mL’de; *E. orientale* (topraküstü), *E. orientale* (kök), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstralarında 128 µg/mL’ de antifungal aktivite belirlenmiştir MFS/MFC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 30-51 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde *E. floccosum*’a çok benzer sonuçlar elde edilmiştir *M. gypseum* karşı her iki yöntemde *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök) ve *E. plantagineum* (toprak üstü) ekstralarında 64 µg/mL’de; *E. orientale* (topraküstü), *E. orientale* (kök), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve) ekstralarında 128 µg/mL’ de antifungal aktivite belirlenmiştir MFS/MFC; $\geq 512/-$, IC₅₀ ise; 41-65 µg/mL aralığında belirlenmiştir.

S. aureus, *S. mutans*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *T. rubrum*, *E. floccosum* ve *M. gypseum*'un; *E. vulgare* (MeOH, kök), *E. vulgare* (MeOH, toprak üstü kısım), *E. plantagineum* (MeOH, kök), *E. plantagineum* (MeOH, toprak üstü kısım), *E. orientale* (MeOH, kök), *E. orientale* (MeOH, toprak üstü kısım), *P. americana* (MeOH, meyve), *P. americana* (MeOH, yaprak) ekstraktları, absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC_{50}) değerleri Şekil 4.1-4.14. arasında gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Gram-pozitif mikroorganizmalarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/mL), minimum bakteriyostatik/-sidal (MBS/-MBC) değerleri ve absorpsiyon değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri

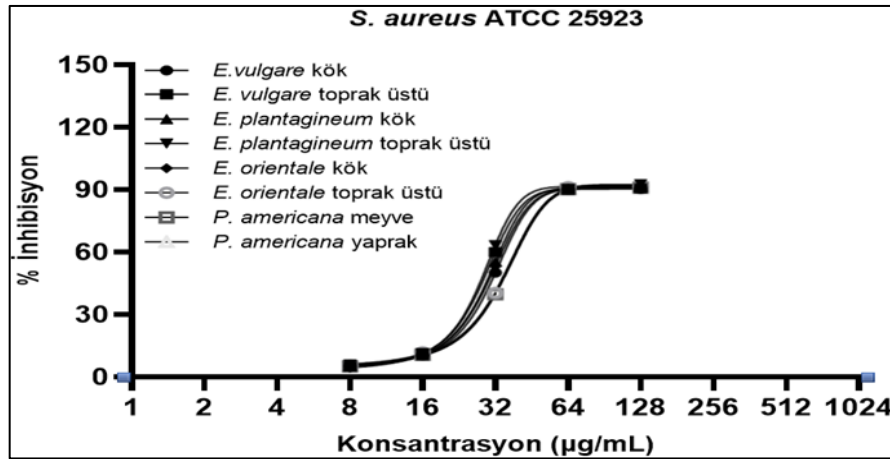
Ekstreler	Gram-pozitif Mikroorganizmalar															
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923				<i>S. mutans</i> ATCC 21752				<i>B. subtilis</i> ATCC 6633				<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			
	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀
<i>E. vulgare</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	35	32	32	≥512/-	20	64	64	-/512	48	128	128	≥512/-	62
<i>E. vulgare</i> (topraküstü-MeOH)	64	64	≥512/-	28	64	64	≥512/-	30	32	32	-/512	21	128	128	≥512/-	47
<i>E. plantagineum</i> (kök-MeOH)	64	128	≥512/-	29	64	64	≥512/-	24	32	32	-/512	21	128	128	≥512/-	54
<i>E. plantagineum</i> (topraküstü-MeOH)	64	64	≥512/-	35	64	64	≥512/-	29	32	32	-/512	18	64	128	≥512/-	46
<i>E. orientale</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	29	64	64	≥512/-	28	64	64	-/512	58	64	64	≥512/-	31
<i>E. orientale</i> (topraküstü-MeOH)	64	128	≥512/-	41	64	64	≥512/-	26	32	32	-/512	30	64	64	≥512/-	36
<i>P. americana</i> (meyve-MeOH)	64	128	≥512/-	22	64	64	≥512/-	24	32	32	-/512	21	64	64	≥512/-	38
<i>P. americana</i> (yaprak-MeOH)	64	64	≥512/-	20	128	128	≥512/-	38	32	32	-/512	18	64	64	≥512/-	41
AMP	0,5				<0,12				0,12				0,25			
LFX	0,25				0,5				-				0,5			

Ekstreler: *Echium vulgare* (kök-MeOH), *Echium vulgare* (topraküstü-MeOH), *Echium plantagineum* (kök-MeOH), *Echium plantagineum* (topraküstü-MeOH), *Echium orientale* (kök-MeOH), *Echium orientale* (topraküstü-MeOH) *Phytolacca americana* (meyve-MeOH), *Phytolacca americana* (yaprak-MeOH). **AMP:** Ampisilin, **LFX:** Levofloksasin. **ATCC:** American Type Culture Collection, *S. aureus:* *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes:* *Streptococcus pyogenes*, *E. faecalis:* *Enterococcus faecalis*, **MİK_a:** Minimum inhibisyon konsantrasyonu **MİK_b:** Resazurin kolorimetrik yöntemle MİK değerleri.

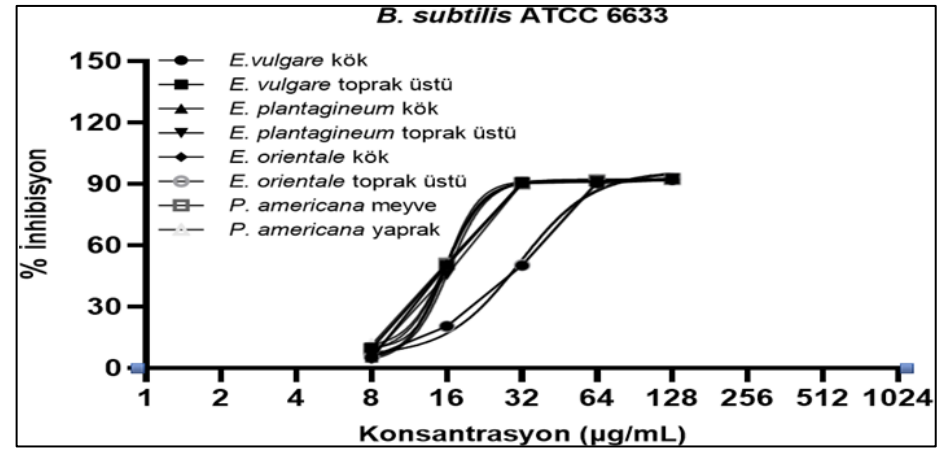
Çizelge 4.2. Gram-negatif mikroorganizmalarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/mL), minimum bakteriyostatik/-sidal(MBS/-MBC) değerleri ve absorbens değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC50) değerleri

Ekstreler	Gram-negatif Mikroorganizmalar															
	<i>E. coli</i> ATCC 25922				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145				<i>K. pneumoniae</i> RSKK 574				<i>A. baumannii</i> RSKK02026			
	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀
<i>E. vulgare</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	31	32	32	≥512/-	17	64	64	≥512/-	37	128	128	-/512	66
<i>E.vulgare</i> (topraküstü-MeOH)	64	64	≥512/-	31	64	64	≥512/-	26	32	32	≥512/-	25	128	128	-/512	72
<i>E. plantagineum</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	28	64	64	≥512/-	34	32	32	≥512/-	22	128	128	-/512	67
<i>E. plantagineum</i> (topraküstü-MeOH)	64	64	≥512/-	35	64	64	≥512/-	34	32	32	≥512/-	22	32	32	-/512	20
<i>E. orientale</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	32	64	64	≥512/-	40	64	64	≥512/-	30	64	64	-/512	40
<i>E. orientale</i> (topraküstü-MeOH)	32	32	≥512/-	29	64	64	≥512/-	40	32	32	≥512/-	27	32	32	-/512	22
<i>P. americana</i> (meyve-MeOH)	64	64	≥512/-	25	64	64	≥512/-	34	64	64	≥512/-	34	64	64	-/512	40
<i>P. americana</i> (yaprak-MeOH)	64	64	≥512/-	28	64	64	≥512/-	34	32	32	≥512/-	20	32	32	-/512	24
GM	-				0,5				-				-			
LFX	<0,12				1				<0,12				0,12			

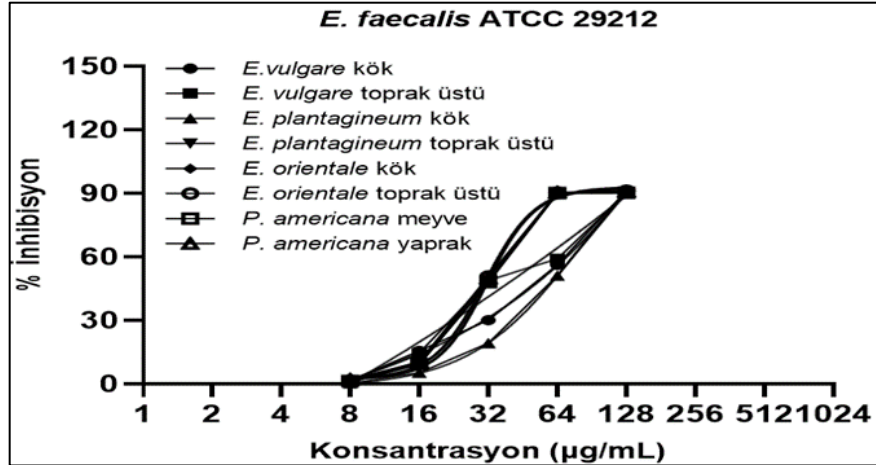
Ekstreler: *Echium vulgare* (kök-MeOH), *Echium vulgare* (topraküstü-MeOH), *Echium plantagineum* (kök-MeOH), *Echium plantagineum* (topraküstü-MeOH), *Echium orientale* (kök-MeOH), *Echium orientale* (topraküstü-MeOH), *Phytolacca americana* (meyve-MeOH), *Phytolacca americana* (yaprak-MeOH). **GEN:** Gentamisin, **LFX:** Levofloksasin. **ATCC;** American Type Culture Collection, **RSKK;** Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun eski kültür koleksiyonu (Refik Saydam Hıfızısıhha Enstitüsü) *S. aureus:* *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes:* *Streptococcus pyogenes*, *E. faecalis:* *Enterococcus faecalis*, **IC₅₀:** biyofilm oluşumuna karşı %50 inhibisyon konsantrasyonu değerleri **MİK_a:** Minimum inhibisyon konsantrasyonu **MİK_b:** Resazurin kolorimetrik yöntemle MİK değerleri.



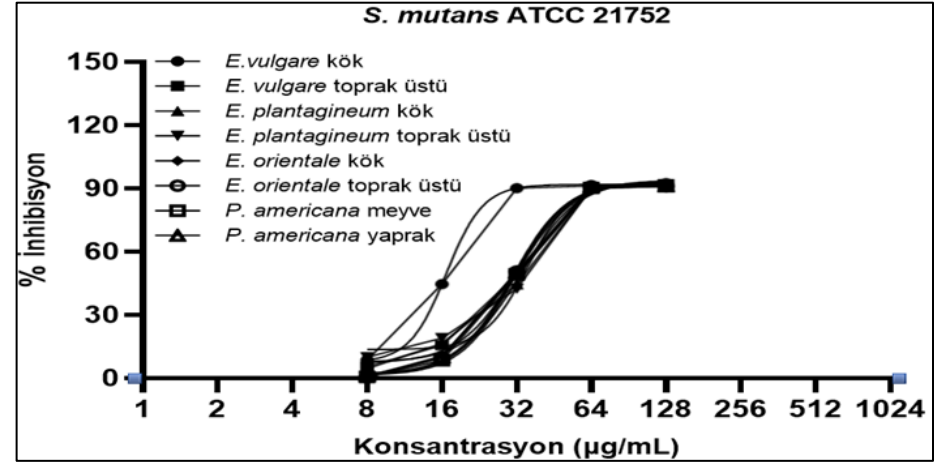
Şekil 4.1. *S. aureus*'a karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



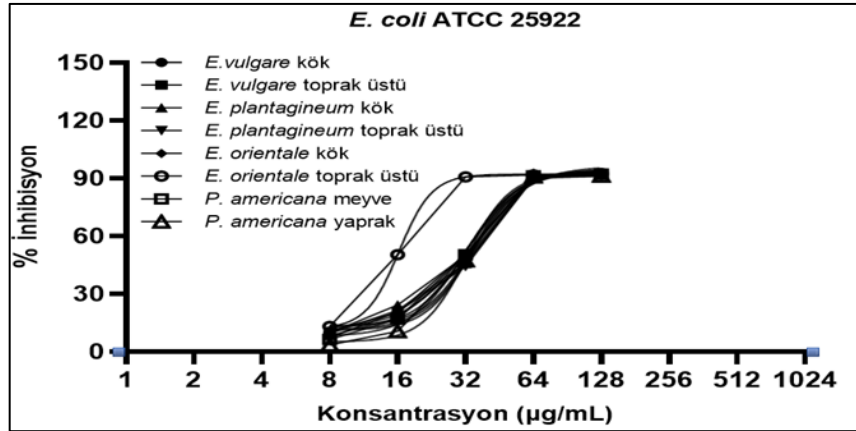
Şekil 4.2. *B. subtilis*'e karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



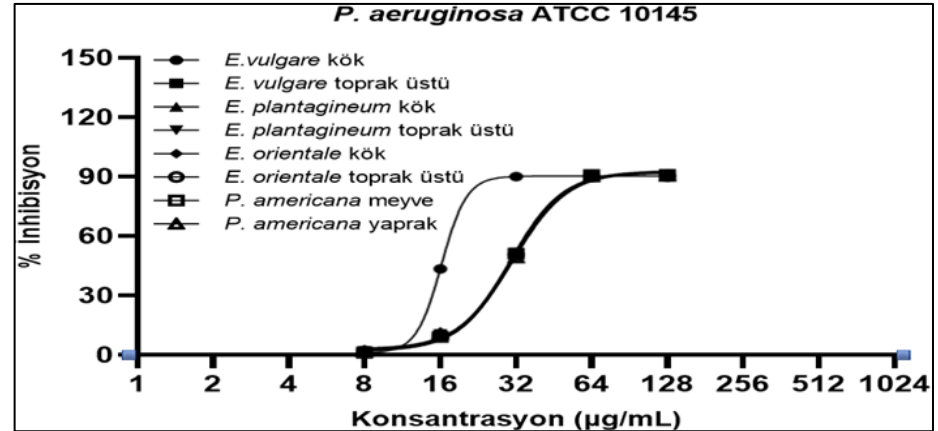
Şekil 4.3. *E. faecalis*'e karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



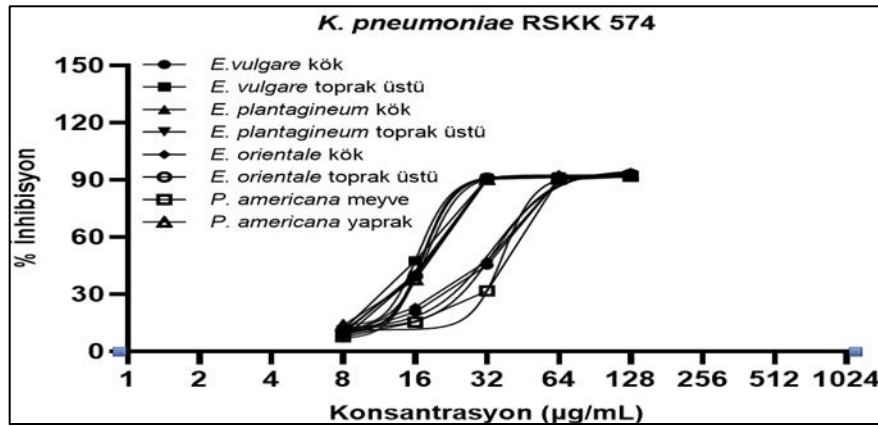
Şekil 4.4. *S. mutans*'a karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



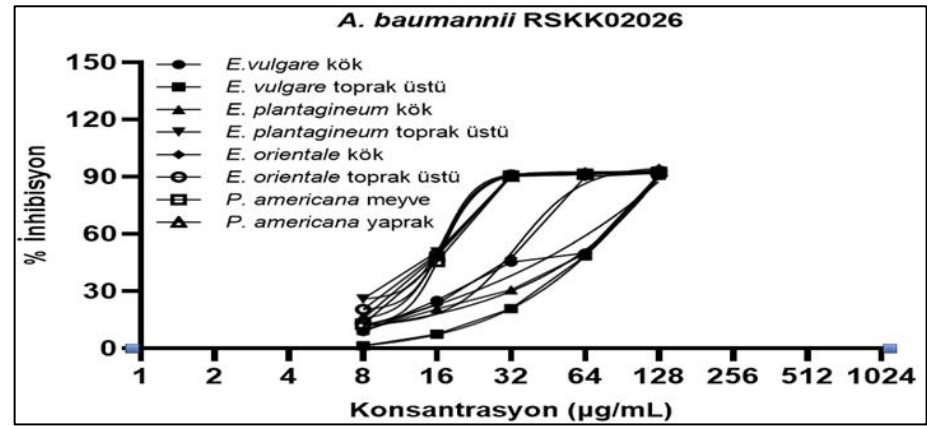
Şekil 4.5. *E. coli*'ye karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



Şekil 4.6. *P. aeruginosa*'ya karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



Şekil 4.7. *K. pneumoniae*'ye karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



Şekil 4.8. *A. baumannii*'ye karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri

Çizelge 4.3. Maya benzeri funguslarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/mL), minimum fungistatik/-sidal (MFS/-MFC) değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri

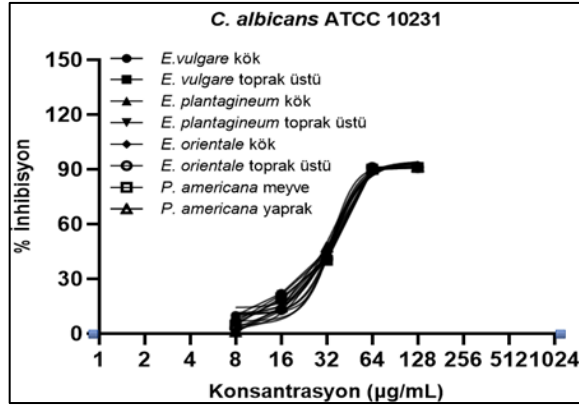
Ekstreler	Maya Benzeri Funguslar											
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231				<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90028				<i>C. krusei</i> ATCC 6258			
	MIC _a	MIC _b	MFS/ MFC	IC ₅₀	MIC _a	MIC _b	MFS/ MFC	IC ₅₀	MIC _a	MIC _b	MFS/ MFC	IC ₅₀
<i>E. vulgare</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	41	128	128	≥512/-	65	128	128	≥512/-	93
<i>E. vulgare</i> (topraküstü- MeOH)	64	64	≥512/-	31	128	128	≥512/-	70	128	128	≥512/-	74
<i>E. plantagineum</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	31	128	128	≥512/-	65	128	128	≥512/-	49
<i>E. plantagineum</i> (topraküstü- MeOH)	64	64	≥512/-	43	128	128	≥512/-	72	128	128	≥512/-	74
<i>E. orientale</i> (kök-MeOH)	128	128	≥512/-	65	128	128	≥512/-	67	128	128	≥512/-	65
<i>E. orientale</i> (topraküstü- MeOH)	128	128	≥512/-	70	128	128	≥512/-	55	128	128	≥512/-	55
<i>P. americana</i> (meyve-MeOH)	64	64	≥512/-	12	256	256	≥512/-	15	256	256	≥512/-	19
<i>P. americana</i> (yaprak-MeOH)	64	64	≥512/-	13	256	256	≥512/-	15	256	256	≥512/-	18
KET	2				2				4			
FLU	4				4				64			

Ekstreler: *Echium vulgare* (kök-MeOH), *Echium vulgare* (topraküstü-MeOH), *Echium plantagineum* (kök-MeOH), *Echium plantagineum* (topraküstü-MeOH), *Echium orientale* (kök-MeOH), *Echium orientale* (topraküstü-MeOH), *Phytolacca americana* (meyve-MeOH), *Phytolacca americana* (yaprak-MeOH). **FLU:** flukonazole, **KET:** ketokonazol, **ATCC;** American Type Culture Collection., ***C. albicans:*** *Candida albicans*, ***C. parapsilosis:*** *Candida parapsilosis*, ***C. krusei:*** *Candida krusei*. **IC₅₀:** biyofilm oluşumuna karşı %50 inhibisyon konsantrasyonu değerleri **MİK_a:** Minimum inhibisyon konsantrasyonu **MİK_b:** Resazurin kolorimetrik yöntemle MİK değerleri.

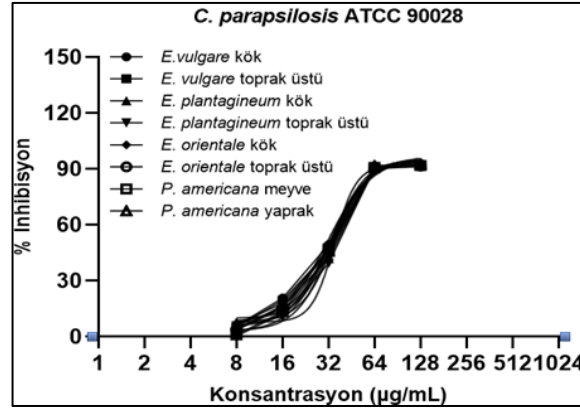
Çizelge 4.4. Dermatofitlerde, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin mikrodilüsyon yöntemi ve Resazurin kolorimetrik yöntem tahlili kullanılarak elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/ mL), minimum fungistatik/-sidal (MFS/-MFC) değerleri ve absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri

Ekstreler					Dermatofitler							
	<i>T. rubrum</i> RSKK486				<i>E. floccosum</i> RSKK3027				<i>M. gypseum</i> NCPF 580			
	MİK _a	MİK _b	MFS/ MFC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀	MİK _a	MİK _b	MBS/ MBC	IC ₅₀
<i>E. vulgare</i> (kök-MeOH)	32	32	≥512/-	28	64	64	≥512/-	30	64	64	≥512/-	61
<i>E. vulgare</i> (topraküstü- MeOH)	32	32	≥512/-	22	64	64	≥512/-	44	64	64	≥512/-	41
<i>E. plantagineum</i> (kök-MeOH)	32	32	≥512/-	19	64	64	≥512/-	45	64	64	≥512/-	58
<i>E. plantagineum</i> (topraküstü- MeOH)	32	32	≥512/-	16	64	64	≥512/-	48	64	64	≥512/-	58
<i>E. orientale</i> (kök-MeOH)	64	64	≥512/-	24	128	128	≥512/-	51	128	128	≥512/-	65
<i>E. orientale</i> (topraküstü- MeOH)	64	64	≥512/-	24	128	128	≥512/-	45	128	128	≥512/-	65
<i>P. americana</i> (meyve-MeOH)	32	32	≥512/-	12	128	128	≥512/-	15	128	128	≥512/-	19
<i>P. americana</i> (yaprak-MeOH)	32	32	≥512/-	13	128	128	≥512/-	15	128	128	≥512/-	18
ITRA	0,25				0,25				0,25			
GRI	0,5				0,5				0,5			
TER	0,125				0,125				0,125			

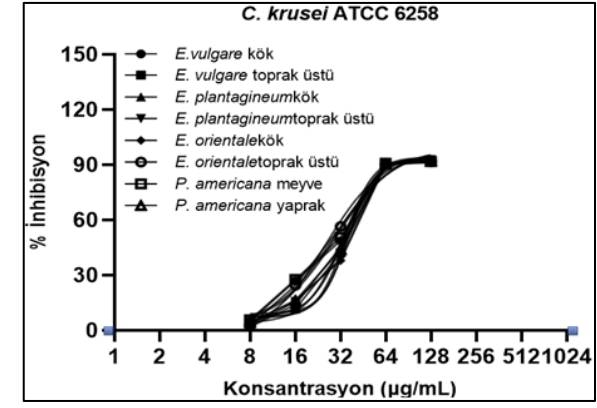
Ekstreler: *Echium vulgare* (kök-MeOH), *Echium vulgare* (topraküstü-MeOH), *Echium plantagineum* (kök-MeOH), *Echium plantagineum* (topraküstü-MeOH), *Echium orientale* (kök-MeOH), *Echium orientale* (topraküstü-MeOH), *Phytolacca americana* (meyve-MeOH), *Phytolacca americana* (yaprak-MeOH). **ITRA:** İtrakonazol, **GRI:** Griseofulvin, **TER:** Terbinafin, **RSKK:** Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun eski kültür koleksiyonu (Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü), **T. rubrum:** *Trycophyton rubrum*, **E. floccosum:** *Epidermophyton floccosum*, **M. gypseum:** *Microsporum gypseum*, **NCPF:** National Collection of Pathogenic Fungi, **IC₅₀:** biyofilm oluşumuna karşı %50 inhibisyon konsantrasyonu değerleri **MİK_a:** Minimum inhibisyon konsantrasyonu **MİK_b:** Resazurin kolorimetrik yöntemle MİK.



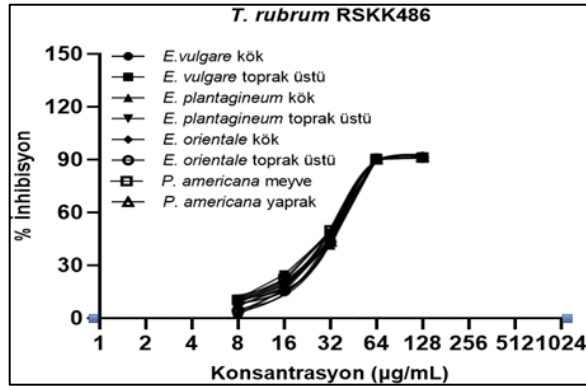
Şekil 4.9. *C. albicans* 'a karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



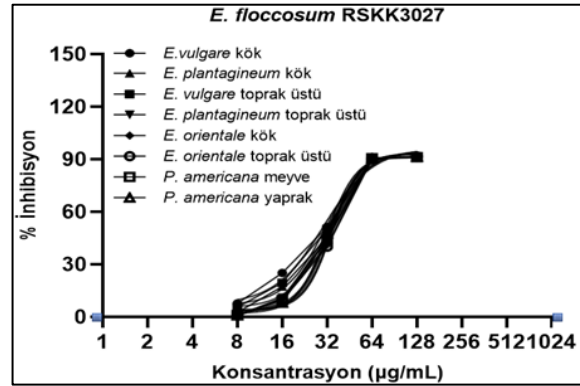
Şekil 4.10. *C. parapsilosis* 'e karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



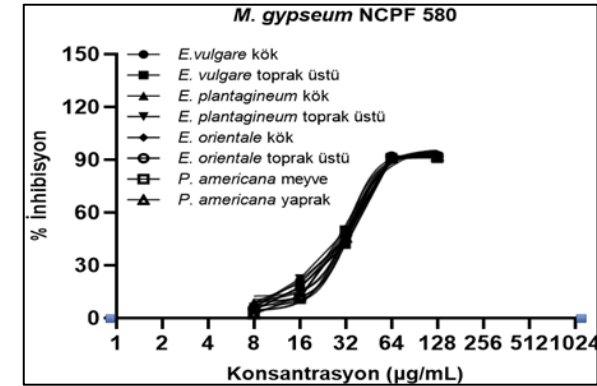
Şekil 4.11. *C. krusei* 'ye karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



Şekil 4.12. *T. rubrum* 'a karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



Şekil 4.13. *E. floccosum* 'a karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri



Şekil 4.14. *M. gypseum* 'a karşı *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *P. americana* metanol ekstraktları % inhibisyon değerleri

5. TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç dünya çapındaki en büyük sorunlardan biridir. Antibiyofilm aktif bileşenlerin varlığına hala ihtiyaç olduğu açıktır. Biyofilm üreten suşların neden olduğu enfeksiyonlar daha kapsamlı tedavilere ihtiyaç duymaktadır ve bu konu halen önemini korumaktadır. Bu noktada antibiyotik dirençli biyofilm topluluklarına karşı alternatif stratejilere ve yeni anti-biyofilm ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal kaynaklardan elde edilen çeşitli bileşiklerin antimikrobiyal maddeler, antiseptikler ve dezenfektanlar olarak fayda sağladığı kanıtlanmıştır. Bu tezde Türkiye’de yetişen *E. vulgare* (kök), *E. vulgare* (topraküstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (topraküstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (topraküstü), *P. americana* (meyve), *P. americana* (yaprak) metanol ekstralarında *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *T. rubrum*, *E. floccosum*, ve *M. gypseum*’a karşı antimikrobiyal aktivite minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK); 32-256 µg/mL aralığında belirlenmiştir. Anti-biyofilm aktivite tüm ekstralarda Resazurin kolorimetrik yöntem ile IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu) 14-72 µg/mL konsantrasyon aralığında tespit edilmiştir. Test edilen bitkisel ekstralarda testte denenen mikroorganizmalara karşı minimum bakteristatik/-sidal (MBS/MBC) fungistatik/-sidal (MFS/-MFC) aktivite MİK; ≥512/- µg/mL’de belirlenmiştir (Çizelge 4.1.-4.4., Şekil 4.1.-4.14.).

Yapılmış araştırmalarda *E. humile*, *E. lycopsis*, *E. italicum* ve *E. amoenum* gibi farklı *Echium* türleri üzerinde antimikrobiyal aktivite rapor edilmiştir (Tabata 1982; Abolhassani, 2004; Kahyaoğlu, 2008; Morteza-Semnani, 2009; Karakoti, 2022). *Echium* ve *Phytolacca* türlerinin geleneksel tıpta antibakteriyel kullanımı da bulunmaktadır. Ancak *Echium* ve *Phytolacca* türlerinin biyoaktivite çalışmaları ile ilgili az sayıda kaynağa rastlanılmıştır. Bu kaynakta farklı yöntem ve çözücüler kullanılarak *Echium* ve *Phytolacca* türlerinde farklı mikroorganizmalara karşı yapılan aktivite sonuçları rapor edilmiştir. Yapılan bir araştırmada *E. vulgare*’nin (Sezik ve diğerleri, 1997) toprak üstü metanol ekstraları *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* ve *C. albicans*’a karşı denenmiş, antimikrobiyal aktivite göstermediği bildirilmiştir (Kuruüzüm-Uz, Güvenalp, Ströch, Demirezer ve Zeeck, 2004). Bošković ve diğerleri (2022) yaptıkları bir araştırmada *E. vulgare*’nin farklı ekstralarının fenolik içeriklerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre en yüksek fenol ve flavonoid içeriğine sahip etanol ekstresinin *K. pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* ve *Citrobacter freundii*’ye karşı MİK; 3,91 µg/mL konsantrasyonda aktivite belirlemişlerdir. Araştırmada en yüksek tanen içeriğine sahip kloroform

ekstresinde ise *Proteus mirabilis*, *S. typhimurium* *Listeria ivanovii* ve *S. aureus*'a karşı MİK; 3,91 µg/mL konsantrasyonda belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan bir araştırmada *E. khuzistanicum* etanol ekstrelerinde *S. aureus*'a karşı inhibisyon zon çapı: 24,16±1,6 mm, *B. subtilis*'a karşı inhibisyon zon çapı: 24,33±0,57 mm, *S. typhimurium*'a karşı 7,96±1,37 mm, inhibisyon zon çapında antimikrobiyal aktivite görüldüğü bildirilmiştir (Mohammadi, Khosro ve Dinarvand, 2019). İran'da Boraginaceae çiçekleri geleneksel tıpta grip gibi bulaşıcı hastalıklarda ve ateş düşürücü olarak kullanılmakta olduğunu bildiren bir araştırmada Boraginaceae ailesinden *E. amoenum* (hodan) kurutulmuş çiçeklerinin sulu ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile *S. aureus*'ye karşı 4-10 mm zon çapı aralığında rapor edilmiştir (Abolhassani, 2004). Araştırmamızda *E. vulgare* ve *E. plantagineum* kök ve toprak üstü ekstreleri MİK; 32-64 µg/mL konsantrasyon aralığında *E. faecalis* dışındaki Gram pozitif bakterilere karşı aktivite göstermiştir. *P. americana* ekstresi ise 64 µg/mL konsantrasyonda Gram pozitiflere karşı aktivite göstermiştir. *B. subtilis*'e karşı yüksek aktivite *E. orientale* ve *E. vulgare* kök ekstreleri dışındaki tüm ekstrelerde MİK; 32 µg/mL'de görülmüştür (Çizelge 4.1.; Şekil 4.2.). *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'ye karşı MİK; 32-64 µg/mL aralığında tüm ekstreler antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Çizelge 4.2.; Şekil 4.1-4.14.).

Disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer Method) ile yapılan bir araştırmada *Echium* türlerinden *E. orientale* (Akşamşavkı) etanol ekstrelerinde antibakteriyel aktivite araştırdıkları çalışmalarında *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumonia*'ya karşı 9,5-14,3 mm zon çapı aralığında *E. cloacae*'ya karşı antibakteriyel aktivite görülürken *K. pneumonia*'ya karşı düşük aktivite belirlenmiştir. *E. cloacae*'ya karşı en yüksek inhibisyon zon çapı doğal ortamda yetişen *E. orientale* L. için belirlenmiştir (Uçar Türker ve diğerleri, 2018). Agar difüzyon yöntemi ile yapılan araştırmada *Echium* türlerinden *E. rauwolfii* ve *E. horridum* metanol ekstreleri *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. flavus*'a karşı *E. rauwolfii*'nin 7-17 mm zon çapı aralığında belirlenmiştir (El-Shazly, Abdel-All, Tei ve Wink 1999). Araştırmamızda *K. pneumoniae*'ya karşı MİK; 32-64 µg/mL aralığında tüm ekstreler antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Çizelge 4.2.; Şekil 4.8.). *C. parapsilosis*'e karşı *P. americana* ekstreleri haricinde tüm ekstreler MİK;128 µg/mL'de antifungal aktivite göstermiştir (Çizelge 4.3.; Şekil 4.10.)

Disk difüzyon yöntemi ile yapılan bir antimikrobiyal aktivite araştırmasında *Heliotropium* türlerinden *H. subulatum* ekstresinde farklı bakteri ve funguslara karşı 9,35 ± 0,267 mm zon çapı aralığında antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir (Singh, Sahu ve Singh, 2002). Mikrodilüsyon

yöntemiyle *S. epidermidis* 'e ve *P. aeruginosa* 'ya karşı *Heliotropium* türünden *H. strigosum* ' un MİK: 8 mg/mL konsantrasyonda aktivite belirlenmiştir (Hussain ve diğerleri, 2010).

Bu çalışmada *E. vulgare*, *E. plantagineum*, *E. orientale* ve *P. americana* 'nın köklerinin ve toprak üstü kısımlarının tüm metanol ekstraktları antimikrobiyal aktivite MİK; 32-256 µg/ml konsantrasyon aralığında ve IC₅₀; 16-74 µg/mL konsantrasyon aralığında görülmüştür (Çizelge 4.1.-4.4.; Şekil 4.1-4.14.). Antimikrobiyal aktivite araştırma sonuçlarımıza göre *Echium* ve *Phytolacca* metanol ekstraktlarında belirlenen antibiyofilm aktivitede sonuçlarının gerek antiseptik gerekse antimikrobiyal ajan olarak kullanımına yönelik elde edilen ilk *in vitro* araştırma sonuçlarını kapsaması ve ileri çalışmalara yeni aktif bileşenler olarak yön vermesi nedeniyle önem taşımaktadır.

6. SONUÇ

E. vulgare (kök), *E. vulgare* (toprak üstü), *E. plantagineum* (kök), *E. plantagineum* (toprak üstü), *E. orientale* (kök), *E. orientale* (toprak üstü), *P. americana* (yaprak) ve *P. americana* (meyve)'nin metanol ekstreleri ve yanısıra referans antibiyotikler (ampisilin, levofloksasin, gentamisin, itrakonazol, griseofulvin, terbinafin) MİK'leri ($\mu\text{g/mL}$), Minimum bakteriyostatik/-sidal (MBS/MBC; $\mu\text{g/mL}$) veya fungistatik/-sidal (MFS/-MFC; $\mu\text{g/mL}$) etkileri ve IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu)'si *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *T. rubrum*, *E. floccosum* ve *M. gypseum* 'a karşı test edilmiştir.

Tüm ekstreler, test edilen bakteri ve mantarlara karşı 32-256 $\mu\text{g/mL}$ aralığında MİK değerleri göstermiştir. Mikrodilüsyon yönteminde; Resazurin kolorimetrik yöntem ile elde edilen IC₅₀ 14-72 $\mu\text{g/mL}$ aralığında sonuçlar göstermiştir (Şekil 4.1-4.14.). Test edilen numuneler *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *T. rubrum*, *E. floccosum* ve *M. gypseum* 'a karşı hem Minimum bakteristatik/-sidal (MBS/MBC; $\mu\text{g/mL}$) hem de fungistatik/-sidal (MFS/-MFC) aktivite göstermiştir, MİK; $\geq 512/-$ değerinden daha düşük değerlerde duyarlılık göstermiştir (Çizelge 4.1.-4.4.; Şekil 4.1-4.14.).

E. vulgare'nin kök ve toprak üstü ekstreleri MİK; 32-64 $\mu\text{g/mL}$ aralığında Gram pozitif bakterilere (*E. faecalis* hariç) karşı aynı derecede aktivite göstermiştir. *E. orientale* kök ekstraktı tüm Gram pozitif bakterilere karşı MİK; 32 $\mu\text{g/mL}$ ile daha yüksek aktivite göstermiştir. Ek olarak, *E. orientale* ve *E. vulgare* kök ekstreleri dışındaki tüm ekstreler MİK; 32 $\mu\text{g/mL}$ de *B. subtilis*'e karşı daha güçlü etki göstermiştir (Çizelge 4.1.). Tüm ekstreler *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii*'ye karşı MİK; 32-64 $\mu\text{g/mL}$ aralığında antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Çizelge 4.2). *E. vulgare* ve *E. orientale* kök ekstreleri dışındaki tüm ekstreler Gram negatif bakterilere karşı MİK; 32 $\mu\text{g/mL}$ değeriyle *K. pneumonia*'ya göre daha güçlü etki göstermiştir. Ekstrelerden *E. vulgare* ve *E. orientale* kök ekstresi ile *E. plantagineum* toprak üstü ekstresi *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii*'ye karşı MİK; 32 $\mu\text{g/mL}$ de antibakteriyel aktivite göstermiştir. *E. vulgare*'nin (kök, toprak üstü) ve *E. plantagineum* (kök, toprak üstü) ekstreleri referans ilaçlarla karşılaştırıldığında *C. krusei*'ye karşı MİK; 128 $\mu\text{g/mL}$ de önemli derecede antifungal aktivite göstermiştir (Çizelge 4.3.; Şekil 4.11).

Tüm ekstreler *C. parapsilosis*'e karşı MİK;128 µg/mL ile antifungal etki göstermiştir (Çizelge 4.3.; Şekil 4.10.). Taranan tüm ekstreler dermatofitler arasından *T. rubrum*'a karşı daha iyi bir aktivite göstermiştir (MİK; 32 µg/mL), son olarak dermatofitlerin geri kalanında MİK;64-28 µg/mL aralığında antidermatofitik aktivite görülmüştür (Çizelge 4.4. Şekil 4.12.-4.14.).

KAYNAKLAR

- Abolhassani, M. (2004). Antibacterial effect of borage (*Echium amoenum*) on *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8, 382-385.
- Akçelik, N. ve Akçelik, M. (2017). Bakteriyel biyofilmler ve konakçı savunma sistemi ile etkileşimleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 33(1), 15-28.
- Almblad, H., Rybtke, M., Hendiani, S., Andersen, J. B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2019). High levels of cAMP inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation through reduction of the c-di-GMP content. *Microbiology*, 165(3), 324-333.
- Bailly, C. (2021). Medicinal properties and anti-inflammatory components of *Phytolacca* (Shanglu). *Digital Chinese Medicine*, 4(3), 159-169.
- Baker, C. N., Thornsberry, C. and Hawkinson, R. W. (1983). Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(3), 450-457.
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch C. B., Engel J. N. and Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2331-2343.
- Beenken, K. E., Mrak, L. N., Griffin, L. M., Zielinska, A. K., Shaw, L. N., Rice, K. C., Horswill, A. R., Bayles, K. W. and Smeltzer, M. S. (2010). Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Public Library of Science One*, 5(5), 10790.
- Benetton, X. D. (2007). *Biocomplexity and bioelectrochemical influence of biofilms in carbon steel deterioration*, Doctoral Thesis, Mexican Petroleum Institute, Mexican, 26.
- Bierbaum, G., and Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 2-18.
- Boles, B. R. and Horswill, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Public Library of Science One*, 4(4), e1000052.
- Boman, H. G., Agerberth, B. and Boman, A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity*, 61(7), 2978-2984.
- Bošković, I., Đukić, D., Mašković, P. and Mandić, L. (2022). Influence of solvent type on the phenolic content and antimicrobial and antioxidant properties of *Echium vulgare* L. extracts. *Farmacia*, 70, 4.

- Boyce, J. M., Opal, S. M., Chow, J. W., Zervos, M. J., Potter-Bynoe, G., Sherman, C. B., Romulo R. L., Fortna S. and Medeiros, A. A. (1994). Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), 1148-1153.
- Boyd, A. and Chakrabarty, A. M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15(3), 162-168.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R. and Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229-1238.
- Campos, V. L., Escalante, G., Yañez, J., Zaror, C. A. and Mondaca, M. A. (2009). Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from a natural biofilm associated to volcanic rocks of Atacama Desert, Chile. *Journal of basic microbiology*, 49(S1), 93-S97.
- Cegelski, L., Pinkner, J. S., Hammer, N. D., Cusumano, C. K., Hung, C. S., Chorell, E., Åberg, V., Walker J. N., Seed, P. C., Almqvist F., Chapman-Hultgren M. R. and Hultgren, S. J. (2009). Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, 5(12), 913-919.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2011). Multidrug-Resistant Organisms in Non-Hospital Healthcare Settings. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_multidrugFAQ.html.
- Central of Disease Control and Prevantation CDC (1993). *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, United States, 42, 597-599.
- Cho, J. H., Sung, B. H. and Kim, S. C. (2009). Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1564-1569.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Kamysz, W., Orlando, F., Mocchegiani, F., Silvestri C., Licci A., Chiodi L., Łukasiak J., Saba, V. and Scalise, G. (2006). Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides*, 27(6), 1210-1216.
- Clinical and Laboratory Standards Institute National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2008). *Refence method for broth dilution antifungal susceptibility testing filamentous fungi; approved standard*, M38-A2, Wayne, Pennsylvania, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Clinical and Laboratory Standards Institute National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2008). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard*, M27-A3, Wayne, Pennsylvania, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition CLSI document M07-A9*. Wayne, PA, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 1–67.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Eleventh Edition. CLSI document M02-A11*. Wayne, PA, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 1–58.
- Cornaglia, G. and Rossolini, G. M. (2009). Forthcoming therapeutic perspectives for infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(3), 218-223.
- Cotter, P. A. and Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 10(1), 17-23.
- Cushnie, T. T. and Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- Darouiche, R. O., Mansouri, M. D., Gawande, P. V. and Madhyastha, S. (2009). Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB® combination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 88-93.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-122.
- Davis, P. H. (1970). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press, 3, 645.
- De Jesus Pimentel-Filho, N., de Freitas Martins, M. C., Nogueira, G. B., Mantovani, H. C. and Vanetti, M. C. D. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 1-8.
- De La Fuente-Núñez, C., Korolik, V., Bains, M., Nguyen, U., Breidenstein, E. B., Horsman, S., Lewenza, S., Burrows, L. and Hancock, R. E. (2012). Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2696-2704.
- De La Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Haney, E. F., Straus, S. K. and Hancock, R. E. (2014). Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *Public Library of Science Pathogens*, 10(5), 1004152.
- Debnath, B., Singh, W. S., Das, M., Goswami, S., Singh, M. K., Maiti, D. and Manna, K. (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry*, 9, 56-72.

- Del Pozo, J. L. and Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology*, 82, 204–209.
- Devaraj, A., Buzzo, J. R., Mashburn-Warren, L., Gloag, E. S., Novotny, L. A., Stoodley, P., Bakaltz, L. and Goodman, S. D. (2019). The extracellular DNA lattice of bacterial biofilms is structurally related to holliday junction recombination intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 50-60.
- Ding, L. J., Ding, W., Zhang, Y. Q. and Luo, J. X. (2013). Bioguided fractionation and isolation of esculentoside P from *Phytolacca americana*. *Industrial Crops and Products*, 44, 534–541.
- Dojani, S., Lakatos, M., Rascher, U., Wanek, W., Lüttge, U. and Büdel, B. (2007). Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 202(7), 521-529.
- Dufour, D., Leung, V. and Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16.
- Erdemir, F., Polater, E. ve Çırlak, A. (2011). Yeni-yeniden tanımlanan enfeksiyonlar ve enfeksiyon kontrolü. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 27(1), 47-61.
- Fischer, M., Wahl, M. and Friedrichs, G. (2012). Design and field application of a UV-LED based optical fiber biofilm sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 33(1), 172-178.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C. and Sbhatu, D. B. (2019). Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*, 5(8), e02192.
- Ghasemzadeh, A. and Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. and Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriol* 178, 6618-6622.
- Gleńsk, M., Dudek, M. K., Kinkade, P., Santos, E. C., Glinski, V. B., Ferreira, D., Seweryn, E., Kazmierski, S., Calixto, J. B. and Glinski, J. A. (2022). Isolation of echimidine and its c-7 isomers from *Echium plantagineum* L. and their hepatotoxic effect on rat hepatocytes. *Molecules*, 27(9), 2869.
- Gopu, V., Meena, C. K. and Shetty, P. H. (2015). Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: *in-vitro* and *in-silico* evidence. *Public Library of Science One*, 10(8), e0134684.
- Gottler, L. M. and Ramamoorthy, A. (2009). Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan—a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1680-1686.

- Gutiérrez, D., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodríguez, A., García, P. and Ruas-Madiedo, P. (2016). Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology. *Public Library of Science One*, 11(10), 1-17.
- Gün, İ. ve Ekinçi, F.Y. (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda Dergisi*, 34(3), 165-173.
- Ha, D. G. and O'Toole, G. A. (2015). c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbial Biofilms*, 301-317.
- Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., Kruijff, B. and Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313(5793), 1636-1637.
- Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U. and Rehm, B. H. (2014). Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology*, 16(10), 2997-3011.
- Hell, E., Giske, C. G., Nelson, A., Römling, U. and Marchini, G. (2010). Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(2), 211-215.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice S. A., Eberl, L., Molin S., Høiby, N., Kjelleberg, S. and Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87-102.
- Hoopes, J. T., Stark, C. J., Kim, H. A., Sussman, D. J., Donovan, D. M. and Nelson, D. C. (2009). Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1388-1394.
- Horn, H., Reiff, H. and Morgenroth, E. (2003). Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(5), 607-617.
- Höltje, J. V., Mirelman, D., Sharon, N. and Schwarz, U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 124(3), 1067-1076.
- Hsu, S. T. D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A., De Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. J. J. and Van Nuland, N. A. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), 963-967.
- Huang, M. B., Baker, C. N., Banerjee, S. and Tenover, F. C. (1992). Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni* and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12), 3243-3248.
- Hussain, S., Jamil, M., Ullah, F., Khan, A., Ullah, F., Arfan, M., Ahmad, S. and Khatoon, L. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the plant *Heliotropium strigosum*. *African Journal of Biotechnology*, 9(45), 7738-7743.

- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B. J., Preston III, J. F. and Romeo, T. (2005). Depolymerization of β -1, 6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 382-387.
- Jacobsen, S. M., Stickler, D. J., Mobley, H. L. and Shirtliff, M. E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 26-59.
- Jett, B. D., Huycke, M. M. and Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 462-478.
- Johnson, L. R. (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 251(1), 24-34.
- Jones, D. S., Tobler, D. J., Schaperdorth, I., Mainiero, M. and Macalady, J. L. (2010). Community structure of subsurface biofilms in the thermal sulfidic caves of Acquasanta Terme, Italy. *Applied and environmental microbiology*, 76(17), 5902-5910.
- Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Karlowsky, J. A., Sahm, D. F. and Wenzel, R. P. (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3(1), 1-11.
- Kaplan, J. B. (2009). Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *The International Journal of Artificial Organs*, 32(9), 545-554.
- Karakaş, F. P., Yıldırım, A. and Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 641-652.
- Kharidia, R. and Liang, J. F. (2011). The activity of a small lytic peptide PTP-7 on *Staphylococcus aureus* biofilms. *The Journal of Microbiology*, 49, 663-668.
- Klunk, W. E., Pettegrew, J. W. and Abraham, D. J. (1989). Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 37(8), 1273-1281.
- Kumar, S. and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 16.
- Kuruüzüm-Uz, A., Güvenalp, Z., Ströck, K., Demirezer, L. Ö. and Zeeck, A. (2004). Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(9), 833-836.
- Lauderdale, K. J., Boles, B. R., Cheung, A. L. and Horswill, A. R. (2009). Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infection and Immunity*, 77(4), 1623-1635.

- Li, P., Wohland, T., Ho, B. and Ding, J. L. (2004). Perturbation of lipopolysaccharide (LPS) micelles by Sushi 3 (S3) antimicrobial peptide: the importance of an intermolecular disulfide bond in S3 dimer for binding, disruption, and neutralization of LPS. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50150-50156.
- Lieberman, O. J., Orr, M. W., Wang, Y. and Lee, V. T. (2014). High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebselen as an inhibitor of diguanylate cyclases. *ACS Chemical Biology*, 9(1), 183-192.
- Lories, B., Roberfroid, S., Dieltjens, L., De Coster, D., Foster, K. R. and Steenackers, H. P. (2020). Biofilm bacteria use stress responses to detect and respond to competitors. *Current Biology*, 30(7), 1231-1244.
- Ma, L. Z., Wang, D., Liu, Y., Zhang, Z. and Wozniak, D. J. (2022). Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Review of Microbiology*, 76, 413-433.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P. D. and Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 145(2), 283-291.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L. and Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS one*, 4(6), e5822.
- Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P. and Fallarero, A. (2013). Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19434-19451.
- Mihajlovic, M. and Lazaridis, T. (2010). Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(8), 1494-1502.
- Mohamed, J. A. and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1581-1588.
- Mohammadi, S., Khosro, P. Ī. R. Ī. and Dinarvand, M. (2019). Antioxidant and antibacterial effects of some medicinal plants of Iran. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6(1), 62-78.
- Nishino, K., Nikaido, E. and Yamaguchi, A. (2007). Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 9066-9075.
- Orii, T., Okazaki, T., Hata, N., Sugawara, K., Rahman, F. A. and Kuramitz, H. (2017). Development of an attenuated total reflection based fiber-optic sensor for real-time sensing of biofilm formation. *Analytical Sciences*, 33(8), 883-7.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 207–228.
- Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E. C., Rehm, B. H. and Hancock, R. E. (2008). Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity*, 76(9), 4176-4182.
- Özçelik, B., Orhan, I., Kartal, M. and Konuklugil, B. (2010). In vitro testing of antiviral, antibacterial, antifungal effects and cytotoxicity of selected Turkish Phlomis species. *Acta Alimentaria*. 39(2), 109-115.
- Öztürk, İ., Yurtman, A. N., Eraç, B., Gül-Yurtsever, S., Ermertcan, Ş. and Hoşgör-Limoncu, M. (2014). In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratislava Medical Journal*, 115(8), 483- 486.
- Pai, L., Patil, S., Liu, S. and Wen, F. (2023). A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: insights from reviews on antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1-13.
- Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N. and Ballis, A. C. (2008). Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents. *Current Medicinal Chemistry*, 15(30), 3248-3267.
- Parisot, J., Carey, S., Breukink, E., Chan, W. C., Narbad, A. and Bonev, B. (2008). Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 612-618.
- Patra, J. K., Kim, E. S., Oh, K., Kim, H. J., Kim, Y. and Baek, K. H. (2014). Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1-6.
- Payne, D. E., Martin, N. R., Parzych, K. R., Rickard, A. H., Underwood, A. and Boles, B. R. (2013). Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infection and Immunity*, 81(2), 496-504.
- Petersen, M. and Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.
- Petrova, O. E. and Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 67-78.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Ghannoum, M. A., Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Brown S. D., Chaturvedi V., Espinel-Ingroff A., Fowler C. L., Johnson E. M., Knapp C. C., Moutyl M. R., Ostrosky-Zeichner L., Sheehan D. J. and Walsh, T. J. (2009). Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3142-3146.

- Philip-Chandy, R., Scully, P. J., Eldridge, P., Kadim, H. J., Grapin, M. G., Jonca, M. G., D'Ambrosio M. G. and Colin, F. (2000). An optical fiber sensor for biofilm measurement using intensity modulation and image analysis. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 6(5), 764-772.
- Piras, A., Rosa, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Falconieri, D., Dessi, M. A., Özçelik, B. and Koca, U. (2013). Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 46, 317-323.
- Potrykus, K. and Cashel, M. (2008). (p) ppGpp: still magical?. *Annual Review of Microbiology*, 62, 35-51.
- Preda, V. G. and Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3), 100.
- Ravikiran, G., Raju, A. B. and Venugopal, Y. (2011). *Phytolacca americana*: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Bio-Medical Science*, 2, 942-946.
- Renner, L. D. and Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36(5), 347-355.
- Romero, D. and Kolter, R. (2011). Will biofilm disassembly agents make it to market?. *Trends in microbiology*, 19(7), 304-306.
- Römling, U., Galperin, M. Y. and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52.
- Saising, J., Dube, L., Ziebandt, A. K., Voravuthikunchai, S. P., Nega, M. and Götz, F. (2012). Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5804-5810.
- Sambanthamoorthy, K., Luo, C., Pattabiraman, N., Feng, X., Koestler, B., Waters, C. M. and Palys, T. J. (2014). Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *Biofouling*, 30 (1), 17-28.
- Sasaki, K., Abe, H. and Yoshizaki, F. (2002). *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 669-670.
- Schilcher, K. and Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), 10-1128.
- Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4), 201-225.
- Schwarz, S., Loeffler, A. and Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Advances in Veterinary Dermatology*, 8, 95-110.

- Segev-Zarko, L. A., Saar-Dover, R., Brumfeld, V., Mangoni, M. L. and Shai, Y. (2015). Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*, 468(2), 259-270.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka T. and Takeda, Y. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces. *Economic Botany*, 195-211.
- Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L. and Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell*, 135(3), 486-496.
- Shai, Y. and Oren, Z. (2001). From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629-1641.
- Shen, Y., Köller, T., Kreikemeyer, B. and Nelson, D. C. (2013). Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1818-1824.
- Singh, B., Sahu, P. M. and Singh, S. (2002). Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Fitoterapia*, 73(2), 153-155.
- Skoneczny, D., Weston, P. A., Zhu, X., Gurr, G. M., Callaway, R. M. and Weston, L. A. (2015). Metabolic profiling of pyrrolizidine alkaloids in foliage of two *Echium spp.* invaders in Australia—a case of novel weapons?. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26721-26737.
- Tahmouzi, S. (2014). Extraction, antioxidant and antilisterial activities of polysaccharides from the flower of viper's bugloss. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 523-531.
- Tamilvanan, S., Venkateshan, N. and Ludwig, A. (2008). The potential of lipid-and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. *Journal of Controlled Release*, 128(1), 2-22.
- Temel, A. ve Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 48(1), 1-13.
- Thaarup, I. C. and Bjarnsholt, T. (2021). Current *in vitro* biofilm-infected chronic wound models for developing new treatment possibilities. *Advances in Wound Care*, 10(2), 91-102.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y. and Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 7-12.
- Tsang, L. H., Cassat, J. E., Shaw, L. N., Beenken, K. E. and Smeltzer, M. S. (2008). Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus* sarA mutants. *Public Library of Science One*, 3(10), e3361.
- Tülüce, G., Temelli, S. ve Eyigör, A. (2021). Gıda ortamında hayata tutunma: bakteriyel çoğunluk algılama. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 92(1), 83-94.

- Uçar Türker A., Birinci Yıldırım A. and Taş I. (2018). *In vitro* adventitious plant regeneration of *Echium orientale* L., an endemic plant; The evaluation of biological activities and phenolic content. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 55, 264-272.
- Uçar Türker, A. and Yıldırım, A. B. (2013). Evaluation of antibacterial and antitumor activities of some Turkish endemic plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 1003-1010.
- Valdes, L., Gueimonde, M. and Ruas-Madiedo, P. (2015). Monitoring in real time the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* upon the intestinal epithelial cell line HT29. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 66-73.
- Van Duijkeren, E., Schink, A. K., Roberts, M. C., Wang, Y. and Schwarz, S. (2018). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 2-6.
- Vigeant, M. A. S., Ford, R. M., Wagner, M. and Tamm, L. K. (2002). Reversible and irreversible adhesion of motile *Escherichia coli* cells analyzed by total internal reflection aqueous fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2794-2801.
- Wei, X., Ruan, W. and Vrieling, K. (2021). Current knowledge and perspectives of pyrrolizidine alkaloids in pharmacological applications: A mini-review. *Molecules*, 26(7), 1970.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. and Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
- Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3, 163-175.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N. and Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1-7.
- Yang, S. J., Oh, H. M., Chung, S. and Cho, J. C. (2009). *Antarcticimonas flava* gen. nov., sp. nov., isolated from Antarctic coastal seawater. *The Journal of Microbiology*, 47, 517-523.
- Yoda, Y., Hu, Z. Q., Shimamura, T. and Zhao, W. H. (2004). Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10(1), 55-58.
- Zaph, C. (2010). Which species are in your feces?. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 4182-4185.
- Zare, K., Khosrowshahli, M., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Azar, A. M. and Omid, Y. (2011). Callus culture of *Echium italicum* L. towards production of a shikonin derivative. *Natural Product Research*, 25(16), 1480-1487.
- Zhang, L. J. and Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), 14-19.

- Zhang, Y., Xia, B., Li, M., Shi, J., Long, Y., Jin, Y., Bai, F., Cheng, Z., Jin S. and Wu, W. (2018). HigB reciprocally controls biofilm formation and the expression of type III secretion system genes through influencing the intracellular c-di-GMP level in *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 10 (11), 424.
- Zhao, W. H., Hu, Z. Q., Hara, Y. and Shimamura, T. (2002). Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2266-2268.
- Zhong, N., Liao, Q., Zhu, X. and Chen, R. (2014). A fiber-optic sensor for accurately monitoring biofilm growth in a hydrogen production photobioreactor. *Analytical Chemistry*, 86(8), 3994-4001.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALTUNBOĞA, Gülbeyaz
Uyruğu : TC.

Eğitim

Derece	Okul/Program	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2023

İş Deneyimi,

Yıl	Yer	Görev
2023-Devam ediyor	E-Gazi Farma Bülten Yayın Kurulu, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri	Araştırma Görevlisi
2023-Devam ediyor	Birim Tanıtım ve Mezunlarla İlişkiler Komisyonu Üyesi, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri	Araştırma Görevlisi
2023 -2024	Sınav Programı Hazırlama Komisyon Üyesi, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri,	Araştırma Görevlisi
2023 -2024	Ders Programı Hazırlama Komisyon Üyesi, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri	Araştırma Görevlisi
2022-Devam ediyor	100.Yıl Komisyonu, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

- Altunboğa G. (2023). *Adli temel bilimler adli doğa bilimleri*. Ankara: Adalet Yayınevi, 4277-4290.
- Altunboğa, G. (2023/16 Mayıs). *Afet ve acil durumlar sonrası mikrobiyolojik yaklaşım*. Afet ve Acil Durum Eczacılığı, Ankara, Türkiye, 1-2.
- Altunboğa, G., Taban, K., Özbek, M. U., Süntar, İ., Özçelik, B. (2023/3 -05 Mayıs). *Antimicrobial activity and anti-biofilm effects of some medicinal plant extracts*. The 9th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-9), Ankara, Türkiye, 119.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..



Jyväskylä on meidän aikalainen

