

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARAYEMİŞ (PRUNUS LAUROCERASUS) BİTKİSİNİN
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HAZEL ARKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARAYEMİŞ (PRUNUS LAUROCERASUS)
BİTKİSİNİN BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HAZEL ARKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2023
T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF THE BIOACTIVE
PROPERTIES OF CHERRY LAUREL
(PRUNUS LAUROCERASUS)**

HAZEL ARKAN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02/06/2023 tarih ve 2023/31 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/06/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hazel Arkan'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Meltem Yeşilçimen Akbaş

ÜYE

: Doç. Dr. Funda Şentürk Akfırat

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem Arslan Aydoğdu

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Yapılan tez çalışmasında, Karayemiş (*Prunus laurocerasus*) meyve ekstraktının antimikrobiyal, yaprak ekstraktının antioksidan, antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri incelendi. Karayemiş meyvesinin etanol ve metanol (saf) çözeltileri, yapraklarının ise etanol (%70) çözeltisi kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Yaprak ekstraktının antioksidan aktivitesi, DPPH serbest radikali giderme yöntemi ile toplam fenolik içeriği (89.27 mg/g) ise Folin-Ciocalteu metodu ile saptandı. Yaprak ekstraktının gallik asit (0.631 mg/L), kateşin (34.874 mg/L), kafeik asit (16.562 mg/L), epikateşin (76.954 mg/L), p-kumarik asit (5.06 mg/L) ferulik asit (24.97 mg/L), ellajik asit (2.211 mg/L) ve kuersetin (2.041 mg/L) içerdiği HPLC yöntemi ile belirlendi. Flavonoid içeriği (3.64 mg/g) alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılarak tayin edildi. Karayemiş meyvesinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkisi tespit edilemedi. Karayemiş yaprak ekstraktının *B. cereus* ATCC 11778 (10 mm), *B. subtilis* ATCC 6633 (8 mm), *E. faecalis* ATCC 29212 (11 mm), *P. syringae* pv.tomato (10 mm), *S. aureus* ATCC 25923 (11 mm), *S. aureus* ATCC 29213 (13 mm) ve *S. uberis* ATCC 700407 (11 mm) suşları üzerinde antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyonu yöntemiyle belirlendi. Ekstraktın *E. faecalis* ATCC 29212 (1.2 mg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (0.3 mg/mL), *S. aureus* ATCC 29213 (1.2 mg/mL) ve *S. uberis* ATCC 700407 (1.2 mg/mL) suşları üzerinde MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) değerleri belirlendi. Ayrıca, ekstraktın *E. faecalis* ATCC 29212 (9.50 mg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 için (9.50 mg/mL), *S. aureus* ATCC 29213 (75.90 mg/mL) ve *S. uberis* ATCC 700407 (4.70 mg/mL) suşları üzerinde MBK (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon) değerleri tespit edildi. Karayemiş yaprak ekstraktının, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşları üzerinde polistiren ve cam yüzeyde antibiyofilm etkisi incelendi. En yüksek antibiyofilm etki (%54) *S. uberis* ATCC 700407 bakterisi ile cam yüzeyde gözlemlendi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, karayemiş yaprağı ekstraktının gıda, sağlık ve kozmetik endüstrisinde kimyasal dezenfektanlara alternatif olarak çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkili bir katkı maddesi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Karayemiş, ekstrakt, antimikrobiyal, antibiyofilm.

SUMMARY

In the thesis study, antimicrobial activities of the fruit extracts and the antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of the leaf extract of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) plant were investigated. Fruits and leaf extracts of cherry laurel were prepared by using ethanol methanol (pure) and ethanol (70%), respectively. The antioxidant activity of the leaf extract was determined by the DPPH free radical scavenging method and total phenolic content (89.27 mg/g) was determined by the Folin-Ciocalteu method. The gallic acid (0.631 mg/L), catechin (34.874 mg/L), caffeic acid (16.562 mg/L), epicatechin (76.954 mg/L), p-coumaric acid (5.06 mg/L) ferulic acid (24.97 mg) /L), ellagic acid (2.211 mg/L) and quercetin (2.041 mg/L) contents of the leaf extract were detected and measured by HPLC. The flavonoid content (3.64 mg/g) of leaf extract was determined by using the aluminum chloride colorimetric method. The fruits extracts did not exhibit antimicrobial activity. Antimicrobial activity of cherry laurel leaf extract on *B. cereus* ATCC 11778 (10 mm), *B. subtilis* ATCC 6633 (8 mm), *E. faecalis* ATCC 29212 (11 mm), *P. syringae* pv.tomato (10 mm), *S. aureus* ATCC 25923 (11 mm), *S. aureus* ATCC 29213 (13 mm) and *S. uberis* 700 (11 mm) strains was determined by agar well diffusion method. MICs (minimal inhibition concentrations) were determined on *E. faecalis* ATCC 29212 (1.2 mg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (0.3 mg/mL), *S. aureus* ATCC 29213 (1.2 mg/mL) and *S. uberis* ATCC 700407 (1.2 mg/mL) strains of the obtained extract. MBC (minimal bacterisidal concentration) values of the extract were determined as *E. faecalis* ATCC 29212 (9.50 mg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (9.50 mg/mL), *S. aureus* ATCC 29213 (75.90 mg/mL) and *S. uberis* ATCC 700407 (4.70 mg/mL). Antibiofilm effects of cherry laurel leaf extract against *E. faecalis* ATCC 29212 and *S. uberis* ATCC 700407 strains on polystyrene and glass surfaces were investigated. The highest antibiofilm effect (54%) was observed on the glass surface against *S. uberis* ATCC 700407 strain.

The results obtained from this study show that, cherry laurel leaf extract can be used as an effective antimicrobial and antibiofilm agent against various microorganisms alternative to chemical disinfectants in the food, health and cosmetic industry

Key Words: Cherry laurel, extract, antimicrobial, antibiofilm.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve birikimini aktaran, çalışmalarına destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a,

Tecrübesini her zaman paylaşan Araş. Gör. Gamze ŞEKER'e, yüksek lisansa başladığımızdan beri bana her konuda destek olan Araş. Gör. Pelin KİRAZ'a

Bitki materyalimi temin ettiğim ve böylelikle tezime büyük katkıda bulunan Selahattin AKBAŞ'a

Hayatım boyunca her kararında yanımda olup beni destekleyen annem Dilek ULUÇAY'a

Bana okumanın önemini anlatan ve eğitim hayatım boyunca beni tüm kalbiyle desteklemiş olan babam Fikret ARKAN'a,

Mikrobiyoloji alanına olan ilgimi keşfetmemi sağlayan ve bu yolda ilk adımlarımı attıran Uz. Vet. Hek. Ali Ülvi Güney GÖKÇELİK'e,

Elimi bir kez olsun bırakmayan, sevgisini ve desteğini hep yüreğimde hissettiğim yol arkadaşım Benan GÖKÇELİK'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2022-A-101-12 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karayemiş	2
2.2. Gıda Patojenleri	2
2.2.1. <i>Bacillus cereus</i>	3
2.2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	4
2.2.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	4
2.2.4. <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.5. <i>Pseudomonas syringae</i>	6
2.2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.7. <i>Streptococcus uberis</i>	7
2.3. Biyoaktif Bileşenler	7
2.4. Gıda Sanayi ve Biyofilmler	9
2.5. Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama)	11
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	13
3.1. Gereçler	13
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	13
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	13
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	13
3.2. Yöntemler	14
3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu	14

3.2.2. Bakteri Suşlarının Saklanması	15
3.2.3. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	15
3.2.4. Karayemiş Yapraklarının Hazırlanması	16
3.2.5. Ekstraksiyon Yöntemi	16
3.2.6. Karayemiş Yaprak Ekstraktının pH Analizi	17
3.2.7. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Kuru Ağırlık Tayini	17
3.2.8. Ekstraktın DPPH Radikali Giderim Aktivitesi	17
3.2.9. Ekstraktın Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	18
3.2.10. Ekstraktın Fenolik Bileşenlerinin Belirlenmesi	19
3.2.11. Ekstraktın Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	19
3.2.12. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	20
3.2.12.1. Agar Kuyu Difüzyonu	20
3.2.12.2. Ekstraktın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi	21
3.2.13. Biyofilm Oluşumu ve Ortadan Kaldırılması	22
3.2.13.1. Farklı Yüzeylerde Biyofilm Oluşumu	22
3.2.13.2. Farklı Yüzeylerde Oluşan Biyofilmlerin Ortadan Kaldırılması	23
3.2.14. Quorum Sensing / Çoğunluk Algılama İnhibisyon Testi	24
3.2.15. İstatiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Karayemiş Yaprak Ekstraktının pH Analizi	26
4.2. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Kuru Ağırlık Tayini	26
4.3. Karayemiş Yaprak Ekstraktının DPPH Radikali Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi	26
4.4. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Toplam Fenolik Madde Miktarı	28
4.5. Karayemiş Yaprak Ekstraktının HPLC Yöntemi ile Fenolik Bileşen Tayini	28
4.6. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Flavonoid Madde Miktarı	29
4.7. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Antimikrobiyal Etkisi	30
4.7.1. Ekstraktın Antimikrobiyal Etkinliğinin Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemiyle Belirlenmesi	30

4.7.2. Ekstraktın Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
4.8. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Antibiyofilm Etkisi	36
4.9 Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama)	38
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikro litre
µg	: Mikro gram
dSu	: Distile su
EPS	: Ekzopolisakkarit
EtOH	: Etanol, etil alkol
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani Broth
LBA	: Luria-Bertani Agar
MeOH	: Metanol, metil alkol
mg	: Miligram
MHB	: Mueller Hinton Broth
mL	: Mililitre
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Ppm	: Milyonda bir birim
TSB	: Triptik Soy Broth
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Ağırlık
W	: Watt, güç birimi, joule/saniye

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş ekstraktının DPPH radikalini giderim aktivitesi ile inhibisyon değerleri (%).	27
4.2: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asidin DPPH radikalini giderim etkisi ile inhibisyon değerleri (%)	27
4.3: Karayemiş yaprak ekstraktının fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogramı	29
4.4: Karayemiş yaprak ekstraktının <i>B. cereus</i> ATCC 11778, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 29213 ve <i>S. uberis</i> ATCC 700407 suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisi ile oluşan inhibisyon zon çapları (mm)	31
4.5: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının kullanılan suşlar üzerindeki antimikrobiyal etkisi	32
4.6: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%)	33
4.7: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının <i>S. aureus</i> ATCC 25923 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%)	34
4.8: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının <i>S. aureus</i> ATCC 29213 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%)	34
4.9: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının <i>S. uberis</i> ATCC 700407 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%)	35
4.10: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşunun PS ve CY'de 48 saatlik inkübasyonu ile oluşan biyofilmlerinin karayemiş ekstraktı (1/8) ve klor (200 ppm) uygulanması ile ortadan kaldırılma oranları (%)	37

4.11:	<i>S. uberis</i> ATCC 700407 bakterisinin PS ve CY’de 48 saatlik inkübasyonu ile oluşan biyofilmalarının karayemiş ekstraktı (1/8) ve klor (200 ppm) uygulanması ile ortadan kaldırılma oranları (%)	38
4.12:	Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (mm)	39

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Tez çalışmasında kullanılan bakteri suşları ve optimum büyüme sıcaklıkları	14
3.2: DPPH giderim aktivitesi	18
3.3: Karayemiş yaprak ekstraktının fenolik bileşen analizi için kullanılan HPLC gradient akış uygulaması	19
3.4: Biyofilm oluşumlarının ortadan kaldırılması (%)	24
4.1: Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) kuru ağırlık tayini	26
4.2: Karayemiş yaprak ekstraktında (etanol, %70) bulunan toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g ekstrakt)	28
4.3: Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) fenolik bileşen karakterizasyonu	29
4.4: Karayemiş yaprak ekstraktında (etanol, %70) bulunan flavonoid madde miktarı (mg QE/g ekstrakt)	30
4.5: Karayemiş yaprak ekstraktının <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 29213 ve <i>S. uberis</i> ATCC 700407 bakterileri üzerinde MİK ve MBK değerleri	35

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Günümüzde, hastalık etmeni bakterilerin mücadelesinde kullanılan antibiyotiklere alternatif doğal antibiyotik olarak adlandırılan tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen antimikrobiyal maddelerin kullanımına duyulan ilgi artmaktadır. Bu araştırmalardaki artışın nedenlerinden bazıları; doğada kolay bulunmaları, ucuz olmaları, doğaya toksik madde yaymamaları, toprak ve su kirliliğine yol açmamaları, insan sağlığını tehdit edecek uzun süreli kalıntılar oluşturmamaları ve hastalık etmenlerine spesifik olmalarıdır [McManus vd., 2002; Mbega vd., 2012].

Bu tez çalışmasında İstanbul Şile bölgesinden toplanan karayemiş meyve ve yaprakları kullanılmıştır. Ancak karayemiş meyvesi ile hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkisinin saptanmaması nedeni ile çalışmaya yaprak ekstraktı ile devam edilmiştir. Böylece, karayemiş yapraklarının fitokimyasal içeriğinin aydınlatılması, antimikrobiyal, antibiyofilm ve anti-quorum sensing etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, karayemiş yapraklarında bulunan biyoaktif bileşiklerin ortaya çıkarılmasında uygulaması kolay, zaman tasarrufu sağlayan ve yüksek ekstraksiyon verimi sağlayan mikrodalga destekli ekstraksiyon metodu kullanılmıştır.

Karayemiş yaprak (etanol) ekstraktının antibiyofilm ve anti-quorum sensing etkilerinin araştırılması üzerine bilinen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışma sonucunda, karayemiş yapraklarından elde edilen ekstraktların insan sağlığına ve çevreye dost, doğal antimikrobiyal ve antibiyofilm ajanı olarak kullanımının sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karayemiş

Karayemiş (*Prunus laurocerasus*) gülgiller (Rosaceae) ailesine aittir. Yaygın olarak “taflan” adıyla bilinen bitki, “laz kirazı”, “laz üzümü” gibi çeşitli yöresel adlara sahiptir. 1546 yılında Fransız Pierre Belon tarafından Trabzon'dan toplanan karayemiş meyvelerinin *Cerasus trapezentina* (Trabzon Kirazı) olarak adlandırıldığı bilinmektedir [Dursun, 2010].

Karayemiş, ılıman iklim bölgelerinde ve orman kıyılarında iyi gelişme gösterir. Türkiye'nin Doğu Karadeniz ve Marmara bölgesinde, bazı Balkanlar, Kuzey İrlanda, Batı Avrupa, Güney ve Batı Kafkasya ve bazı Akdeniz ülkelerinde sıklıkla üretilmektedir [Kolaylı vd., 2003]. Küçük beyaz renkli, kokulu çiçekler açar ve yaprak dökmez. Yaprak boyları 5 – 25 cm uzunluğunda kısa saplı, sivri uçlu ve koyu yeşil renklidir. Meyvenin şekli, tadı ve rengi, yetiştiği bölgeye, toplanma ve saklanma durumuna göre farklılık gösterir. Genel olarak kiraza benzetilen meyveleri çekirdekli ve suludur. Olgunlaştıklarında tiplerine göre açık veya koyu kırmızı, mor siyah renk alırlar. Günümüzde büyüme biçimi, yaprak boyut ve şekli, kışa dayanıklılık açısından farklı 20 kadar taflan kültürü vardır [Alpınar vd., 1991].

Karayemiş yaprak, meyve ve çekirdeği çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Meyve direkt olarak yenilebildiği gibi turşu, reçel, likör şeklinde de tüketilmektedir. Çekirdek ve yaprak kısmında zehirli bir glikozit olan hidrosiyamik asit (HCN) bulunduğu için kullanımına dikkat edilmelidir [Tanker vd., 2007]. Taze yapraklar, anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif etkileri nedeniyle, boğaz ağrısı için ağrı kesici, ateş düşürücü ve tedavi edici ajan olarak kullanılabilir [Erdemoğlu vd., 2003].

2.2. Gıda Patojenleri

Her yıl milyonlarca insanın gıda zehirlenmesi geçirdiği ve binlerce vakanın ölümle sonuçlandığı bilinmektedir [Alzoreky vd., 2003]. Genellikle bu zehirlenme vakalarında etken mikroorganizmaların *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*,

Listeria monocytogenes, *Escherichia coli* ve *Salmonella* türleri olduğu vurgulanmıştır [Beuchat, 2001].

Son yıllarda gıda patojeni mikroorganizmaların sebep olduğu büyük sağlık sorunları ve ekonomik kayıplar nedeniyle, söz konusu bakterilerin kontrol altına alınmasına yönelik yeni teknik ve uygulamalar geliştirilmektedir [Keskin vd., 2011].

Antibiyotikler enfeksiyon hastalıklarında tedavi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnci zamanla artmıştır ve artmaya devam etmektedir.

Antibiyotikler, patojen bakterileri yok ederken bakteriler üzerinde ayırım yapmayıp yararlı bakterileri de yok edebilmektedir. Ayrıca, bağırsaktaki mikrobiyal florayı etkileyerek bağırsak mikrobiyomunun bozulmasına ve ilgili hastalıkların artmasına neden olmaktadır [Çetinbaş vd., 2017]. Bunlara ek olarak, antibiyotik tedavisi nedeniyle mikrobiyomların bozulması antibiyotik direncinin artmasına da neden olabilmektedir [Cammorata vd., 2014].

Tıbbi bitkiler günümüzde farmakolojik ve sentetik olarak üretilen ve birçok hastalığa karşı kullanılabilen ilaçların etken maddesinin oluşumunda rol alan doğal kaynaklardır [Vital vd., 2010].

Özellikle bitkilerin ve bitkilerden elde edilen özütlerin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılması yeni uygulamalardan birisidir.

Maliyetin düşük olması, toksik olmamasından dolayı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilaç elde edilen bitkilere olan talep gittikçe artmaktadır. [Sekar ve Kandavel, 2010].

Yapılan çalışmalarda bitkisel kaynaklı antimikrobiyallere karşı Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere göre daha hassas olduğu gözlenmiştir [Kim vd., 1995; Yuste ve Fung, 2002; Lemay vd., 2002; Bagamboula vd., 2003; Nasar-Abbas ve Halkman, 2004; Şahin, 2006].

2.2.1. *Bacillus cereus*

Bacillus cinsi bakteriler *Bacillaceae* ailesinde yer alan Gram pozitif, çomak veya çubuk şekilli, zorunlu aerob veya fakültatif anaerob, spor oluşturabilen, katalaz pozitif mikroorganizmalardır [Topçal vd., 2014]. Bakteriyel endospor oluşumu, sıcaklık, radyasyon gibi çevresel olumsuzluklara bakterinin uyum sağlayarak cevap vermesi

olayıdır [Higgins, 2012; Abe, 2017]. Bakterilerin optimum büyüme sıcaklığı 30°C olmasına rağmen bazı spor formları ısıtma işlem ve dezenfektanlara karşı dayanıklıdır [Granum vd., 1997]

Bacillus cereus toprakta, et, süt, pirinç, sebze gibi gıdalarda yaygın olarak bulunur. Bazı *Bacillus cereus* sporları 100°C'den daha düşük sıcaklıkta pişirilmiş gıdalarda hayatta kalabilmektedir. Isıya dirençli sporların çoğalması ile gıda zehirlenmeleri meydana gelmektedir. Dolayısıyla gıdalar pişirildikten sonra hemen tüketilmeyecekse hızla soğutulmalı veya 50°C üzerinde saklanmalıdır.

2.2.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis toprakta, hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan potansiyel probiyotik bir mikroorganizmadır. Sinyal molekülü memelilerde bağırsak hücrelerini oksidatif strese ve bariyer fonksiyon kaybına karşı koruyan Hsp27'yi indükleyerek bağırsak florasının dengelenmesini sağlar [Williams., 2007].

Bacillus subtilis suşu, antioksidan ve DNA koruyucu özelliklere sahip olduğu gibi [Prazdnova vd., 2015] fareler üzerinde yapılan çalışmalarda bağışıklığı artırıcı etkisi olduğu da gözlenmiştir [Barnes ve ark., 2007].

Süt içerisinde sayıca çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkardıkları bilinmektedir.

B. subtilis sporları, *B. cereus* sporlarından daha yüksek ısı direncine sahiptir ve gıda zehirlenmesiyle ilişkilendirilen *Bacillus* türlerinin başında gelir [Pendurkar vd., 1989; Jans'tova' vd., 2001].

2.2.3. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, *Enterococcaceae* ailesine ait, Gram pozitif, hareketsiz, fakültatif anaerob, katalaz negatif, yüksek pH ve yüksek tuz içeren çevre koşullarında hayatta kalabilen, patojenik bir mikroorganizmadır. 10 ila 45°C aralığında büyüyebilirler ve 60°C sıcaklıkta 30 dakika hayatta kalabilirler [Tendolkar ve ark., 2003].

İnsan bağırsağı, ağız, vajina, üretra ve safra yollarında normal flora elemanı olarak bulunan enterokoklar düşük virülansa sahip olmalarına rağmen enfeksiyonlarda sıklıkta etken olarak saptanmaya başlanmışlardır [Aguş vd., 2006].

Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan birçok antimikrobiyal ajana karşı belirgin ve artan derecede direnç göstermektedir [Erbek vd., 2002].

2.2.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli halk arasında koli basili olarak tanınmış, *Enterobacteriaceae* ailesine ait, Gram negatif, çomak şekilli, fakültatif anaerob, sporsuz, katalaz pozitif ve genelde hareketli bir mikroorganizmadır.

E. coli, üzerinde sıkça çalışılmış bir model organizma olduğu için hakkında en fazla bilgi sahibi olunan bakteridir.

Optimum büyüme sıcaklığı 30°C -37°C'dir. Memeli hayvanların normal bağırsak florasında büyümeye uyum sağladıkları için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır [Nataro vd., 1998].

Sığır ve koyun eti gibi gıdalar ile, doğru şekilde arıtılmamış sular ile, özellikle hijyenin yetersiz olduğu alanlardan ve bakteriyi taşıyan kişiyle temas ile kolayca bulaşabilir. Hayvanlarda etkisiz olan bazı *E. coli* serotipleri insanlara bulaştığında ciddi hastalık yapıcı etki gösterirler.

Fakültatif anaerob özelliğinden dolayı *E. coli* kirlenme ölçütü amacıyla koliform olarak su arıtım sahalarında kullanılmaktadır. *E. coli*'nin varlığı dışkı kirlenmesinin temel belirtisi olarak kabul edilir.

E. coli 44°C'da laktoz fermentasyonu yapabilmesi ile diğer koliformlardan ayrılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı oldukça dirençli olsa da pastörizasyon ve kaynatma ile ölürler.

2.2.5. *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae *Pseudomonadaceae* ailesine ait ait, Gram negatif, aerob, çubuk şekilli, hareketli ve katalaz pozitif bir mikroorganizmadır. Optimum büyüme sıcaklığı 28°C-30°C'dir.

Adını ilk izole edildiği leylak ağacından (*Syringa vulgaris*) almıştır. Oksidaz pozitif olması, kamçı varlığı ve fermentasyon yapmaması ile *Enterobacteriaceae*'den ayrılır [Krieg, 1984].

P. syringae'nin bazı saprofit olarak görev alan suşları, hasat sonrası çürüklere karşı biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılmaktadır [Janisiewicz vd., 1992]. Aynı zamanda *P. syringae* ekonomik açıdan önemli olan birçok ekin türünü enfekte eden bir bitki patojenidir [Xin vd., 2018].

P. syringae çeşitli virülans faktörleri taşır. Bu sayede konağın bağışıklık tepkisini manipüle ederek, özellikle bitkinin stoma kapanmasını baskılayarak hastalık semptomlarına neden olur [Ichinose vd., 2013]. Yüksek sıcaklık bitki bağışıklığını ve *P. syringae* patojen virülansını etkileyerek hastalıkları arttırabilir.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (Pst)'nin domateste tohum kaynaklı bakteriyel benek hastalığına sebep olmaktadır. [Karabüyük vd., 2019].

2.2.6. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus *Staphylococcaceae* ailesine ait Gram pozitif, aerob veya fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, hareketsiz ve katalaz pozitif bir mikroorganizmadır.

S. aureus, kolonilerin altın pigmentasyonu ve koagülaz, mannitol fermentasyonu ve deoksiribonükleaz testlerinin pozitif sonuçları ile diğer stafilokok türlerinden ayrılmaktadır [Wilkinson vd., 1997]. Katalaz pozitif özelliği ile de Streptokok türünden ayrılır.

S. aureus insan cildinde, burun ve boğaz boşluğunda ve bağırsak mukozalarında mikrobiyota üyesi olarak bulunurlar. Ancak iç dokulara veya kan dolaşımına girmesine izin verilirse belirli konakçı ve çevresel koşullar altında hastalığa neden olabilirler [Lowy, 1998; Schenck vd., 2016].

S. aureus bakterisi insanlarda bakteriyemi, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit, septik artrit, akciğer enfeksiyonları, gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu ve idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıklara yol açar [Tong vd., 2015].

S. aureus suşları, antibiyotik duyarlılık testlerinde ve ticari ürünler için kalite kontrol amacıyla kontrol suşu olarak yaygın olarak kullanılır. Metisilin başta olmak üzere çeşitli antibiyotiklere duyarlıdır [Treangen vd., 2014].

Metisilin direncine sahip stafilokoklar tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere ilave olarak aminoglikozidler, makrolidler ve linkozamidleri de içeren çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmalardır [Doğantekin vd., 2015].

2.2.7. *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis *Streptococcaceae* ailesine ait Gram pozitif, yuvarlak şekilli, fakültatif anaerob, sporsuz, hareketsiz ve katalaz negatif bir mikroorganizmadır. Ürerken çiftler halinde durmaları ya da zincir oluşturmaları karakteristik özellikleridir.

S. uberis bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda varlığında fırsatçı bir patojendir [Eryıldız vd., 2017]. Özellikle memeli hayvanların ağız, mide, deri, genital ve solunum yoluna, meme başı ve kanallarına, yaralara yerleşebilmektedir [Ward vd., 2009]. Yüksek süt verimi elde edilen sığırlarda mastitislerin başlıca etmenlerinden biri *S. uberis* bakterisidir.

2.3. Biyoaktif Bileşenler

Fitokimyasallar, bitkilerden elde edilen temel olmayan biyoaktif bileşenler olarak tanımlanır. Biyoaktif bileşenler bitkisel kaynaklarda bulunan, bitkinin büyümesi, gelişmesi ve hayatta kalmasında avantaj sağlayan çeşitli antimikrobiyal etkiye sahip ikincil metabolitlerdir.

Bileşikler bitkiye özgü renk, tat ve koku özelliklerinin oluşmasında etkili olmanın yanı sıra patojenlere, parazitlere, ultraviyole radyasyona karşı da koruyucu özellik gösterirler [Kris-Etherton vd., 2002; Vermerris vd., 2008]. Bu bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövde gibi tüm bölümlerinde bulunabilmektedir [Cemeroğlu vd., 2004].

Meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve diğer bitkilerde bulunan, temel olarak fenolik bileşikler, karotenoidler, glikosinolatlar, stilbenler, lignanlar, alkaloidler, organosülfür bileşikleri ve bitki sterolleri olmak üzere çeşitli gruplara ayrılan 5.000'den fazla fitokimyasal tanımlanmıştır [Huang vd., 2010].

Bitkisel antimikrobiyal ajanların en geniş grubunu oluşturan ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılmaktadır [Bravo, 1998; Erdoğan vd., 2013].

Flavonoidler ise iskelet yapılarının farklı olmasından kaynaklı, flavon, flavonol, flavanon, flavanol ve izoflavonoid gibi alt gruplara sahiptir.

Biyoaktif bileşenlerin in vitro ve in vivo koşullarda geniş aralıkta antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmektedir. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [Albayrak vd., 2010].

DPPH radikal söndürücü kapasite yöntemi bir antioksidan molekülünün süpürme potansiyeli ve saf bileşiklerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi için standart, kolay ve hızlı kolorimetrik yöntemlerden biri olarak sıklıkla tercih edilmektedir [Scalzo, 2008].

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. Molekülde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşmasına neden olur [Albayrak vd., 2010]. Bir antioksidan tarafından DPPH serbest radikale hidrojen atomu transferi gerçekleştiğinde DPPH indirgenir, 517 nm'de absorpsiyon azalır ve renk açılması gözlenir.

Yapılan araştırmalar, doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturan fenolik bileşiklerin oksidatif baskı sonucu meydana gelen hücre ölümlerini engellediğini göstermiştir [Schoeter vd., 2000; Youdim vd., 2001; Parihar vd., 2003; Deveci vd., 2016]. Flavonoidler serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler.

Biyoaktif bileşenlerin iltihaplanmalar, bazı kanser türleri, kalp-damar hastalıkları, obezite, diyabet, katarakt, nörolojik bozukluklar, kemik erimesi gibi hastalıkların oluşum riskini azalttığı ve bağışıklık sistemi düzenlenmesi üzerine olumlu etkileri olduğu bilinmektedir [Morton vd., 2000; Pietta, 2000; Neilson 2017].

Ancak, ikincil metabolitlerin bitkilerde doğal olarak az miktarlarda bulunması, insanoğlu için her zaman bir dezavantaj olmuştur. Dolayısıyla fenolik bileşiklerin etki mekanizmalarının ve canlılar üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi farmakoloji, gıda

ve sanayi sektörü başta olmak üzere kullanım alanlarının genişletilmesi güncel ve önemli konulardandır.

Bitki ekstraktlarının kolay elde edilebilir ve maliyetinin düşük olması endüstrideki kullanım alanlarını da genişletmektedir [Özyurt, 2005].

Yapılan araştırmalar bitkisel materyallerin güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip çok sayıda fitokimyasal bileşik içerdiğini göstermektedir [Kırca, 2007].

Fenolik bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, antidiyabetik, antiobesite, antiseptik antikarsinogenik, antimutajenik özellikleri bulunmaktadır. Bundan dolayı fenolik bileşiklerin doğal kaynaklardan elde edilmesi oldukça önemlidir [Aybastier vd., 2012].

2.4. Gıda Sanayi ve Biyofilmler

Biyofilm; mikroorganizmaların kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik madde veya ekzopolisakkarit matriks (EPS) içerisinde birbirlerine veya bulundukları yüzeylere tutunmalarını sağlayan bir yapıdır [Kartal vd., 2021].

Uygun koşullar oluştuğunda mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşturulabilir. Biyofilm oluşumunda bakterilerin yüzeylere bağlanmasını ve bağlanma düzeylerini bakteri türü, hücre duvarının yapısı, ortamın sıcaklığı ve pH'si, bağlandığı yüzeyin özelliği, ortamdaki besin maddelerinin içeriği ve miktarı gibi birçok faktör etkiler.

Biyofilm oluşumu, mikrobiyal tutunma, bakteri hücrelerinin EPS üreterek yüzeye bağlanması, kolonizasyon ve biyofilm yapısının olgunlaşması, kopma evreleri olmak üzere dört basamakta gerçekleşmektedir.

Biyofilm yapısında bakterilerin yaşaması ve üremesi EPS'nin organizasyonuna bağlıdır. EPS matriksi başlıca DNA, protein, lipit ve polisakkaritlerden oluşmaktadır. EPS'ler, bir hücrenin bir substrata veya başka bir hücreye bağlanmasından sorumludur ve yüzeye tutunmayı kolaylaştırır [Wilderer, 1989; Garrett vd., 2008].

Biyofilmler aynı veya farklı bakteri türlerinden oluşabilir. Biyofilm oluşturan bakteriler etrafındaki popülasyon yoğunluğunu algılamak ve aralarında etkileşim sağlamak için çoğunluk algılama sinyal sistemini kullanırlar. Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinden oluşan bu sistem, bakteri hücresinde spesifik genlerin

ekspresyonunu etkileyerek EPS salgılanmasını sağlar ve olgun biyofilm yapısının oluşumunu destekler [Temel vd., 2018].

Biyofilm tabakasının içerdiği mikrokolonilerin altında ve arasında bulunan su, besin gibi maddelerin akışını ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları bulunmaktadır [Gün vd., 2009; Knetsch vd., 2011]. Dışarıdan besin maddelerinin alımı kolaylaştırılmış difüzyon ile gerçekleştirilirken, kanallar içerisindeki dolaşım pasif difüzyon ile sağlanır.

Ancak biyofilm yapılarının alt katmanlarına yeteri kadar besin ulaşamaması alt katmanda bulunan bakterilerin metabolizma hızını olumsuz etkiler. Metabolizma hızının düşmesi EPS üretimini azaltır ve bakteriler alt tabakadan üst tabakaya doğru göç etme eğilimi gösterirler. Bazı bakteriler biyofilm yapısından koparak ayrılır ve farklı bölgelerde yeniden kolonize olabilirler.

Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar, konak hücre savunması, antimikrobiyal ajanlar ve olumsuz çevre koşulları gibi etkilerden korunabilmektedir [Costerton vd., 1978; Hoiby vd., 2017]. Bakteriler biyotik ya da abiyotik yüzeylere tutunduklarında serbest durumlarına göre daha hızlı çoğalabilmektedir. Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu, yaşadıkları çevrede planktonik formlarına göre daha fazla hayatta kalma ve büyüme şansına sahip olduğu bildirilmektedir [Hassan vd., 2011].

Bakteriler polistiren, cam, paslanmaz çelik, kauçuk, ahşap gibi farklı yüzeylerde biyofilm oluşturma eğilimi göstermektedir [Djordjevic vd., 2002; Srey vd., 2013].

Biyofilmler dezenfektan ve antibiyotiklere karşı dirençlidirler [Kartal vd., 2021]. Biyofilm içerisinde üreyen bakterilerin direnç göstermesi gıda, tıp, diş hekimliği, su sistemleri gibi pek çok alanda soruna neden olmaktadır.

Gıda endüstrisinde antibakteriyel etkisinden dolayı genellikle klor uygulaması tercih edilmektedir [Meyer, 2003]. Klorun yeterli etki gösterememesi ve toksik kalıntılar bırakmasından dolayı alternatif dezenfektanlara duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır [Ekici vd., 2006]. Bitkiler ve bitkilerden elde edilen özütler, antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri sebebiyle dezenfektanların yerine geçebilecek, sağlığa zararı olmayan, maliyeti düşük doğal ajanlardır.

2.5. Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama)

Quorum sensing (QS) / Çoğunluk Algılama mikroorganizmaların çevresindeki popülasyon yoğunluğunu algılamasını ve bu yoğunluğa bağlı olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan, hücreler arası iletişimi gerçekleştiren bir haberleşme sistemidir.

Hücrelerarası QS mekanizması ile mikroorganizmalar, ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte ve çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını tespit edebilmektedir. Bu sayede, koloni olarak göstermeleri gereken davranış şekillerini bir hücreden diğerine sinyal molekülleriyle iletebilmektedir [Annous vd., 2009; Gün vd., 2009].

Mikroorganizmalar, çeşitli fizyolojik aktiviteleri düzenlemek için QS iletişim yolunu kullanır. Bu süreçler simbiyoz, virülans, konjugasyon, antibiyotik üretimi, biyoluminesans ve biyofilm oluşumunu içerir [Novick, 2008].

Bakteriler arası haberleşme tek bir bakteri türü içinde ve çeşitli türler arasında meydana gelebilir. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler, QS iletişim yöntemini kullanır, ancak mekanizmalarında farklılıklar vardır [Bassler, 1999]

Bakterilerde çoğunluk algılamada iki grup sinyal molekülü görev almaktadır. Genel olarak, Gram negatif bakteriler, otoindükleyiciler olarak açillenmiş homoserin laktonları kullanırken Gram pozitif bakteriler, iletişim kurmak için işlenmiş oligopeptidleri kullanır [Raffa vd., 2005].

Bacillus, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* cinsindeki bakterilerin QS mekanizmasını kullanarak genetik yeteneklerini geliştirmekte ve biyofilm oluşturabilmektedir [Podbielski vd., 2004].

Oluşumunda QS'in de rol aldığı bilinen biyofilmde EPS içinde gömülü olarak canlılıklarını sürdürebilen mikroorganizmalar, antibiyotiklerden, antimikrobiyal ürünlerden, fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslerden korunmaktadır [Nouraldin vd., 2016]. Bakteriler arasındaki QS sisteminin bozulmasına veya engellenmesine Quorum Sensing İnhibisyonu veya Quorum Quenching adı verilmektedir [Uroz vd., 2009]. QS zincirinin kırılmasının insanlardaki enfeksiyonlar ve gıda bozulmasıyla ilişkili mikrobiyal gen ekspresyonu üzerinde büyük rol oynayabileceği düşünülmektedir [Tülüce ve vd., 2021].

Chromobacterium violaceum, *Neisseriaceae* ailesinde yer alan, Gram negatif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyan, hareketli ve katalaz pozitif bir mikroorganizmadır. Bu bakteri viyolasin adı verilen mor renkli antioksidan bir pigment üretmekte ve QS İnhibisyonu çalışmalarında indikatör olarak kullanılmaktadır [Hamidi, 2013].

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan maya özütü (yeast extract), sodyum klorür, agar, glukoz, etanol, metanol, asetik asit, alüminyum klorür ve potasyum asetat Merck (Darmstadt, Almanya)'ten satın alındı. Tripton Conda (Pronadisa, İspanya)'dan, Mueller Hinton Broth ve Tryptic Soy Broth (TSB) Biolife (Milano, İtalya)'dan temin edildi. Kristal viyole Biomerieux (Marcy-l'Étoile, Fransa)'ten, Folin-Ciocalteu reaktifi ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Alfa Aesar, Kandel, Almanya)'dan satın alındı. Gallik asit, kuersetin ve 96 kuyulu mikrotitrasyon plakaları Sigma Aldrich (Darmstadt, Almanya)'ten temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada; çalkalamalı İnkübatör (New Brunswick Scientific, Excella E24, Almanya), etüv (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Almanya), ELISA okuyucu (BMG LABTECH FLUOstar Omega, Offenburg, Almanya), evaporatör (Heidolph Hei-VAP, Almanya), hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya, hızlı karıştırıcı (IKA Vortex Genius 3, Almanya, inkübatör (Binder, Almanya), manyetik karıştırıcı (IKA RH basic 2, Almanya), mikrodalga (Arçelik MD-524S, Türkiye), mutfak tipi öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Türkiye), otoklav (Hirayama, HVE-50, Japonya), pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) santrifüj Cihazı (Gyrozen 1248R, Kore), spektrofotometre (Shimadzu UV-1280) cihazları kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve optimum büyüme sıcaklıkları tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan bakteri suşları ve optimum büyüme sıcaklıkları.

Mikroorganizmalar	Sıcaklık (°C)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	30
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	30
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	30
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	37
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	37

3.2. Yöntemler

3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Ön kültürlenmede kullanılmak üzere hazırlanan, Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri için 10 gram tripton ve 5 gram maya özütü (yeast extract) 1000 mL distile su içerisine eklendi.

Pasajlama, koloni sayımı ve agar kuyu difüzyonu deneyi gerçekleştirilmek üzere hazırlanan Luria-Bertani Agar (LBA) katı besiyeri için 10 gram tripton, 5 gram maya özütü (yeast extract), 5 gram NaCl 1000 mL distile su içerisine eklendi. Agar kuyu difüzyonunda için hazırlanan besiyerlerine 12 gram, pasajlama ve hücre sayımı için hazırlanan besiyerlerine 15 gram agar eklendi.

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) deneyinde kullanılmak üzere hazırlanan Mueller-Hinton (MHB) sıvı besiyeri için 22 gram MHB 1000 mL distile su içerisine eklendi.

Antibiyofilm etki belirmede kullanılmak üzere hazırlanan Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besiyeri için 30 gram TSB 1000 mL distile su içerisine eklendi. TSB besiyeri içerisine eklenmek üzere %2 Glukoz hazırlandı.

İçerisinde şeker barındıran besiyerlerinin şeker içeriği besiyerinden ayrı olarak otoklavlandı.

Tüm bileşenler hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya) ile tartıldı. Homojen bir karışım elde etmek amacıyla besiyerleri ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA RH basic 2, Almanya) ile karıştırıldı.

Hazırlanan besiyerleri otoklav cihazı (Hirayama HVE 50) yardımıyla 121°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca steril edildi.

Besiyerleri steril edildikten sonra sıcaklığının yaklaşık 50°C'ye kadar düşmesi beklendi. İçerisinde agar bulunan besiyerleri ise 17 mL hacimde steril koşullarda petri kaplarına aktararak donması beklendi. Uygun sıcaklıklar sağlandıktan sonra besiyerleri muhafaza edilmek üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.2. Bakteri Suşlarının Saklanması

Bakteri suşları steril LB agar katı besiyeri üzerine öze yardımıyla ekildi. Petriler bir gece boyunca optimum sıcaklıkta bir etüvde (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Almanya) inkübe edildi. Kültürler +4 °C sıcaklıkta saklandı ve haftada bir olacak şekilde pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.3. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Agar kuyu difüzyonu ve MİK deneyleri için; bakteri kültürleri steril LB besiyeri ile hazırlandı. Antibiyofilm etki için; bakteri kültürleri steril TSB (%2 Glukoz) besiyeri ile hazırlandı.

50 mL hacimli erlenmeyer içerisine 10 mL besiyeri eklendi. Bakteri kültürleri katı besiyerinden steril öze yardımıyla alınarak erlenmeyer içerisindeki besiyerine ekildi.

Kültürler her bakteri için optimum sıcaklığında ve 180 rpm çalkalama hızında yaklaşık 16-18 saat çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Innova 42, Almanya) kullanılarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerinin absorbans miktarları spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1280, Almanya) kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.2.4. Karayemiş Meyve ve Yapraklarının Hazırlanması

Çalışmada gülgiller (*Rosaceae*) ailesine ait karayemiş (*Prunus laurocerasus*) meyve ve yaprakları İstanbul Şile bölgesinden toplandı. Meyve ve yapraklar distile su yardımıyla yıkanıp tozlarından arındırıldı. Kurutma kâğıdı ile oda sıcaklığında kurutulup kullanılmak üzere -20°C sıcaklıkta saklandı.

3.2.5. Ekstraksiyon Yöntemi

Karayemiş meyve ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla etanol ve metanol çözücülerini kullanarak ekstraksiyon yöntemi gerçekleştirildi.

125 gram çekirdeklerinden ayrılmış karayemiş meyvesi bir hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya) ile tartıldı. Meyveler ev tipi blender yardımıyla püre haline getirilerek 100 ml saf metanol ve saf etanol ile karıştırıldı. Karışım ev tipi bir mikrodalga fırında (Arçelik MD-524S, İstanbul, Türkiye) 120W 'da 3 dakika boyunca ısıtıldı. Tortu gazlı bez yardımıyla süzüldü. Elde edilen sıvı 4000 rpm +4C'de 10 dakika santrifüj (Gyrozen 1248R, Daejeon, Kore) edildi. Süpernatant kaba filtre kâğıdı ile süzüldü. Elde kalan tortusuz sıvıdan fazla suyun uzaklaştırılması işlemi bir evaporatör cihazı (Heidolph Hei-VAP, Bavyera, Almanya) kullanılarak 50°C 100 rpm dönme hızında gerçekleştirildi. Evaporasyon işlemi sonucunda 15 mL ekstrakt çözeltisi elde edildi.

Karayemiş yaprak ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla etanol (%70) kullanılarak ekstraksiyon yöntemi gerçekleştirildi.

10 gram karayemiş yaprağı bir hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya) ile tartıldı. Yapraklar mutfak tipi bir öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Türkiye) yardımıyla parçalandı. Toz haline gelen yapraklar 100 mL etanol (%70) ile karıştırıldı. Karışım ev tipi bir mikrodalga fırında (Arçelik MD-524S, İstanbul, Türkiye) 120W 'da 3 dakika boyunca ısıtıldı. Tortu gazlı bez yardımıyla süzüldü. Elde edilen toplam 95 mL'lik sıvı 4000 rpm +4C'de 10 dakika santrifüj (Gyrozen 1248R, Daejeon, Kore) edildi. Süpernatant kaba filtre kâğıdı ile süzüldü. Elde kalan tortusuz sıvıdan fazla suyun uzaklaştırılması işlemi bir evaporatör cihazı (Heidolph Hei-VAP, Bavyera,

Almanya) kullanılarak 50°C 100 rpm dönme hızında gerçekleştirildi. Evaporasyon işlemi sonucunda 12 mL ekstrakt çözeltisi elde edildi.

Ekstraktlar deneyde kullanılmak üzere -20°C'de ağzı kapalı tüplerde ve ışık görmeyecek şekilde muhafaza edildi. Kullanım için, -20°C'den çıkarıldıktan sonra 4000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi ve olabilecek tortulardan arındırıldı.

Karayemiş meyvesi ile hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkisinin görülmemesi nedeni ile çalışmaya yaprak ekstraktı ile devam edilmiştir.

3.2.6. Karayemiş Yaprak Ekstraktının pH Analizi

Karayemiş ekstraktının pH değeri ölçümü için bir pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) cihazı kullanıldı. Analiz işlemi oda sıcaklığında (İçerisinde ekstrakt bulunan cam beher içerisine pH elektrodu daldırıldı. Elektrodun sabitliği korunarak hafifçe karıştırılma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.7. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Kuru Ağırlık Tayini

Elde edilen etanol ekstraktından steril mikro santrifüj tüplerine 1 mL örnek alındı. Hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya) ile boş santrifüj tüpleri tartılarak darası alındı. İçerisinde ekstrakt bulunan santrifüj tüpleri tartılarak ağırlıklar not edildi.

60°C sıcaklıkta bir etüvde (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Almanya) 48 saat süre boyunca ekstraktlar kurumaya bırakıldı. Süre sonunda tekrar tartım işlemi gerçekleştirilerek sonuçlar not edildi. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı.

3.2.8. Ekstraktın 2,2 –Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikali Giderim Aktivitesi

Elde edilen ekstraktın 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini giderim etkisi belirlendi [Blois, 1958]. DPPH radikal derişimi 50 ppm olacak şekilde metanol içerisinde hazırlandı.

Farklı zamanlarda hazırlanmış ekstraktlar çeşitli konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512) metanol içerisinde seyreltilti. Standart

olarak kullanılan gallik asit 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığında metanol içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Steril tüpler içerisine 0.1 mL ekstrakt / gallik asit, 3.9 mL DPPH radikali eklendi. Blank olarak 0.1 mL metanole 3.9 DPPH radikali eklendi. Karışımlar vortex karıştırıcı yardımıyla karıştırıldıktan sonra 37°C sıcaklıkta, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler steril bir mikrotitrasyon plakasına aktararak 517 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutularak absorbans değerleri ölçüldü.

DPPH radikali giderim aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı: [Mishra vd., 2012].

$$DPPH \text{ giderim aktivitesi}(\% \text{ inhibisyon}) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (3.2)$$

A0: Kontrol solüsyonunun absorbansı,

A1: Ekstrakt veya gallik asit çözeltilerinin absorbansı

3.2.9. Ekstraktın Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu metodu ile belirlendi [Celep vd., 2012].

Karayemiş yaprak etanol ekstraktı metanol içerisinde 1/10 oranında seyreltildi. Standart olarak kullanılan gallik asit 400-800 µg/mL konsantrasyon aralığında metanol içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Önceden otoklavlanarak steril edilmiş vida kapaklı cam tüpler içerisine 20 µL ekstrakt veya gallik asit eklendi. 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (0.5 N) ile karıştırıldı. Karışıma 300 µL %20 doymuş sodyum karbonat eklendi. Hacim distile su ile 2 mL'e tamamlandı. Karışım 30 dakika 45°C'de karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 765 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutularak absorbans değerleri ölçüldü.

Tüm deneyler en az üç kez tekrarlandı. Ekstraktta bulunan toplam fenolik madde içeriği gallik asit eşdeğeri olarak hesaplandı [Singleton vd., 1965].

3.2.10. Ekstraktın Fenolik Bileşenlerinin Belirlenmesi

Karayemiş yaprak ekstraktının fenolik bileşen içeriği HPLC (Shimadzu Nexera 2, Japonya) cihazı kullanılarak belirlendi. Gallik asit, kateşin, kafeik asit, epikteşin, p-kumarik asit, ferulik asit, ellajik asit ve kuersetin belirlenmesi için C18 kolonu (ODS-4, 4.6 x 250 mm, 5 µm, GL Sciences) ile Diode Array dedektörü (PDA/DAD) kullanılarak 278 nm dalga boyunda analiz edildi. Yürütücü faz olarak asetik asit (%2) ve metanol (%100) olmak üzere 2 farklı solüsyon kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 30°C ve yürütücü faz akış hızı ise 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı.

Analiz süresince asetik asit (%2) ve metanol (%100) fazlarının gradient akışı tablo 3.3.'de verildi.

Tablo 3.3: Karayemiş yaprak ekstraktının fenolik bileşen analizi için kullanılan HPLC gradient akış uygulaması.

Zaman (dakika)	Asetik asit (%2)	Metanol (%100)
0	95%	5%
3	95%	5%
18	80%	20%
20	80%	20%
30	60%	40%
40	50%	50%
50	0%	100%
50	95%	5%
57	95%	5%
58	Bitiş	Bitiş

3.2.11. Ekstraktın Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) flavonoid içeriği alüminyum klorür kolorimetrik yöntemiyle belirlendi [Sharma vd., 2017].

Standart olarak kullanılan kuersetin 200-500 µg/mL konsantrasyon aralığında metanol içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Steril vida kapaklı santrifüj tüpler içerisine 0.1 mL seyreltilmemiş ekstrakt veya kuersetin ile 1.5 mL metanol eklendi. Karışıma 0.1 mL alüminyum klorür (%10) ve 0.1 mL potasyum asetat solüsyonu (1M) eklendi. 2.8 mL distile su ile hacim tamamlanarak iyice karıştırıldı. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 417 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutularak absorbans değerleri ölçüldü.

Tüm deneyler en az üç kez tekrarlandı. Ekstraktta bulunan flavonoid içeriği kuersetin eşdeğeri olarak hesaplandı [Sharma vd., 2016].

3.2.12. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

3.2.12.1. Agar Kuyu Difüzyonu

Karayemiş meyve (etanol ve metanol) Gram pozitif *B. cereus* ATCC 11778 ve Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 bakterileri üzerinde ve karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70), Gram pozitif *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. uberis* ATCC 700407 ve Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve *P. syringae* pv tomato bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkisini tayin etmek amacıyla agar kuyu difüzyonu deneyi yapıldı. Bakteriler LB broth besiyeri içerisinde optimum sıcaklık değerlerinde (30-37°C) yaklaşık 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerinin absorbans miktarları spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1280, Almanya) kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Final bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmak üzere bakteriler steril %0.9 fizyolojik tuzlu su içerisinde seyreltildi.

Ekstraktlar çeşitli konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) distile su içerisinde seyreltildi.

Karayemiş yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğini karşılaştırmak üzere gentamisin (10 µg/mL, *E. faecalis* ATCC 29212 suşu için 100 µg/mL) antibiyotiği kullanıldı.

Bakteri kültürleri ve ekstrakt dilüsyonlarının homojen dağılımını sağlamak için bir vortex karıştırıcı (IKA Vortex Genius 3, Almanya) kullanıldı.

Bakteri kültürlerinden steril koşullarda 100 µL alınıp LB agar içeren petrilere yayıldı. Yayma işleminden sonra agar üzerine 6 mm çapında kuyular açıldı. Açılan kuyulara 40 µL ekstrakt dilüsyonları (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) ve Gentamisin (10-100 µg/mL) antibiyotiği eklendi. Bakteriler optimum (30-37°C) sıcaklık değerlerinde inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 16-18 saat sonunda oluşan inhibisyon zon çapları gentamisin antibiyotiği ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Ekstrakt kontrolü sağlamak amacıyla bitki materyali eklenmeden etanol (%70) ve distile su kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Evaporasyon işlemi sonucunda elde edilen 12 mL çözeltisi ile agar kuyu difüzyonu deneyi gerçekleştirildi.

3.2.12.2. Ekstraktın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. uberis* ATCC 700407 bakterilerine karşı minimal inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için 96 kuyulu mikrotitrasyon plakalarında deneyler gerçekleştirildi. İlgili bakteriler LB (Luria-Bertani) besiyerinde (30-37°C) sıcaklıkta yaklaşık 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerinin absorbans miktarları bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1280, Almanya) kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüldü.

Mikrotitrasyon plakalardaki her bir kuyudaki final bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland olacak şekilde belirlendi (Ayla, 2018). Bu değeri elde etmek için bakteriler önceden hazırlanmış olan steril MHB (Mueller-Hinton Broth) içerisinde seyreltildi. Hazırlanan ekstrakt (etanol, %70) çeşitli konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512) distile su içerisinde seyreltildi.

Seyreltilmiş bakteri kültürlerinden ve ekstrakt çözeltilerinden 100'er µL ilgili kuyucuklara eklendi. Besiyeri kontrol sağlamak amacıyla ilgili kuyucuklara 100 µL steril besiyeri eklendi.

Plakalar 37°C sıcaklıkta gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda koloni sayımı gerçekleştirebilmek için kuyucuklardan 30 µL alınarak

önceden hazırlanıp steril edilmiş içerisinde 3 mL fizyolojik tuzlu su (%0.9, FTS) bulunduran tüplere son hacim sabit tutulacak şekilde eklenerek dilüsyonlar yapıldı.

Tüplerden ve plakadan 100 µL alınarak LB agar besiyeri bulunan petrilere ekim yapıldı. Bakteri kültürleri bulunan petrilere bakteri suşlarına göre 30-37°C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda koloni sayımı gerçekleştirildi.

3.2.13. Biyofilm Oluşumu ve Ortadan Kaldırılması

3.2.13.1. Farklı Yüzeylerde Biyofilmlerin Oluşumu

E. faecalis ATCC 29212, *S. uberis* ATCC 700407 bakterileri ön kültürlenme amacıyla %2 glukoz içeren TSB besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta ve 180 rpm çalkalama hızında yaklaşık 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerinin absorbansları bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1280, Almanya) kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Final bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde TSB (%2 Glukoz) besiyeri kullanılarak ayarlandı.

E. faecalis ATCC 29212, *S. uberis* ATCC 700407 bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesi polistiren yüzey ve cam yüzey kullanılarak belirlendi.

Polistiren yüzey (PS) için 96 kuyulu mikrotitrasyon plakaları kullanıldı. Deney öncesinde plakalar UV ışık altında 20 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra, steril bir kabin içerisinde, plakanın her bir kuyusuna bakteri kültürlerinden 200 µL eklendi.

Cam yüzey (CY) için vida kapaklı cam tüpler kullanıldı. Deney öncesinde cam tüpler otoklav cihazı (Hirayama HVE 50) yardımıyla 121°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca steril edildi. Daha sonra, steril bir kabin içerisinde tüplere bakteri kültürlerinden 1 mL eklendi.

Besiyeri kontrolü sağlamak için bir mikrotitrasyon plakasına 200 µL ve cam tüplere 1 mL bakteri kültürü eklenmemiş TSB (%2 glukoz) besiyeri eklendi. Plakalar ve cam tüpler 48 saat süre ile 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

3.2.13.2. Farklı Yüzeylerde Oluşan Biyofilmlerin Ortadan Kaldırılması

Önceden hazırlanıp -20°C 'de saklanan etanol ekstraktı oda sıcaklığında çözününceye kadar bekletildi. 4000 rpm çalkalama hızında 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Distile su ile 1/8 oranında seyreltildi.

Ekstraktın etkisinin karşılaştırılması için klor solüsyonu 200 ppm olacak şekilde [Kokumer, 2013] hesaplandı.

Biyofilm oluşum için yapılan inkübasyonlardan 48 saat sonra PS ve CY yüzeyde bulunan kültürler nazikçe dökülerek üçer kez distile su ile yıkandı ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

PS yüzey için kuyucuklara 200 μL 1/8 oranında seyreltilen yaprak ekstraktı ve 200 ppm klor solüsyonu eklenerek 10 dakika bekletildi. Kontrol amacıyla en az üç kuyuya ekstrakt veya klor solüsyonu ilave edilmedi. Süre sonunda plaka ters çevrilerek ekstrakt ve klor solüsyonu nazikçe döküldü. Ekstraktın bulunduğu kuyucuklar üç kez, klor solüsyonunun bulunduğu kuyucuklar ise altı kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Hücre tutunmasını belirleyebilmek amacıyla her bir kuyucuk 200 μL hacimde % 0.5 oranında (v/v) kristal viyole çözeltisi ile [Lee vd., 2015] 10 dakika muamele edildi. Kristal viyole ile boyanan kuyular üç kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyuya 200 μL hacimde, 95:5 oranında etanol: asetik asit çözeltisi eklenerek 10 dakika bekletildi.

CY yüzey için tüplerin içerisine 1 mL 1/8 oranında seyreltilen yaprak ekstraktı ve 200 ppm klor solüsyonu eklenerek 10 dakika muamele edildi. Kontrol amacıyla en az üç tüpe ekstrakt veya klor solüsyonu ilave edilmedi. Süre sonunda tüpler ters çevrilerek ekstrakt ve klor solüsyonu nazikçe döküldü. Ekstraktın bulunduğu tüpler üç kez, klor solüsyonun bulunduğu tüpler ise altı kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Hücre tutunmasını belirleyebilmek amacıyla her bir tüpe 1 mL hacimde % 0.5 oranında (v/v) kristal viyole çözeltisi ilave edildi ve 10 dakika bekletildi. Kristal viyole ile boyanan tüplerin içerikleri ters çevrilerek boşaltılarak üç kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Her bir tüpe 1 mL hacimde, 95:5 oranında etanol: asetik asit çözeltisi eklenerek 10 dakika muamele edildi.

Bu aşamalardan sonra, her kuyudan ve tüpten 200 μL örnek alınarak steril bir mikrotitrasyon plakasına aktarıldı. 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (BMG

LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) okutularak absorbans değerleri ölçüldü [Bakkiyaraj vd., 2013].

Biyofilm oluşumlarının ortadan kaldırılması oranları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı [Pitts vd., 2003].

$$(\% \text{ Ortadan Kaldırma}) = \frac{(C - B) - (E - EB)}{C - B} \times 100 \quad (3.4.)$$

C: bakteri içeren besiyeri,

B: bakteri içermeyen besiyeri,

E: ekstraktla veya klorla muamele edilmiş bakteri içeren besiyeri,

EB: ekstraktla veya klorla muamele edilmiş bakteri içermeyen besiyeri

3.2.14. Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama) İnhibisyon testi

Karayemiş yaprak ekstraktının QS sinyallerini bloke etmeleri; viyolasin isimli mor bir pigment ürettiği bilinen *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 biyosensör suşu kullanılarak test edildi.

50 mL hacimli erlenmeyer içerisine 10 mL LB besiyeri eklendi. -80°C sıcaklıkta stok halde bulunan *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisi oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra 1/10 oranında seyreltilerek (yaklaşık 400 µL) alınarak erlenmeyer içerisindeki besiyerine eklendi ve 30°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında yaklaşık 16-18 saat bir inkübatör (New Brunswick Innova 42, Almanya) kullanılarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültürünün absorbans miktarları spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1280, Almanya) kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüldü.

Önceden hazırlanıp otoklavlanan Luria-Bertani Agar (LBA) (12g/L) besiyeri oda sıcaklığında 50°C'ye kadar soğutuldu. Besiyerinin içerisine 1/10 oranında *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisi eklendi. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra 9 cm çaplı petri kaplarına 17 mL bakteri bulunan besiyeri döküldü ve donması beklendi.

Farklı zamanlarda hazırlanmış ekstraktlar çeşitli konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) distile su içerisinde seyreltildi.

Agar üzerine steril bir pastör pipetinin arka geniş kısmı ile 6 mm çapında kuyular açıldı. Açılan kuyulara 40 µL ekstrakt dilüsyonları (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32)

eklendi. Petriler 37°C sıcaklıkta 16-18 saat süre ile inkübe edildikten sonra oluşan renksiz opak zonlar ölçüldü.

3.2.15. İstatiksel Analiz

Bu tez çalışmasında tüm deneyler en az üç kez tekrar edildi. İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2016 programı ile belirlendi. *p* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile karayemiş ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiği ile, biyofilm oluşumunun ortadan kaldırma etkinliği ise klor solüsyonu uygulaması ile karşılaştırılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Karayemiş Yaprak Ekstraktının pH Analizi

Karayemiş yaprak ekstraktının pH değeri 4.7 olarak belirlendi.

4.2. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Kuru Ağırlık Tayini

Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) farklı seyreltme oranlarındaki kuru ağırlık (mg/mL) miktarları tablo 3'te verildi. Buna göre elde edilen ekstraktın kuru ağırlığı 75.90 mg/mL olarak belirlendi.

Tablo 4.1: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512) hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının kuru ağırlık tayini.

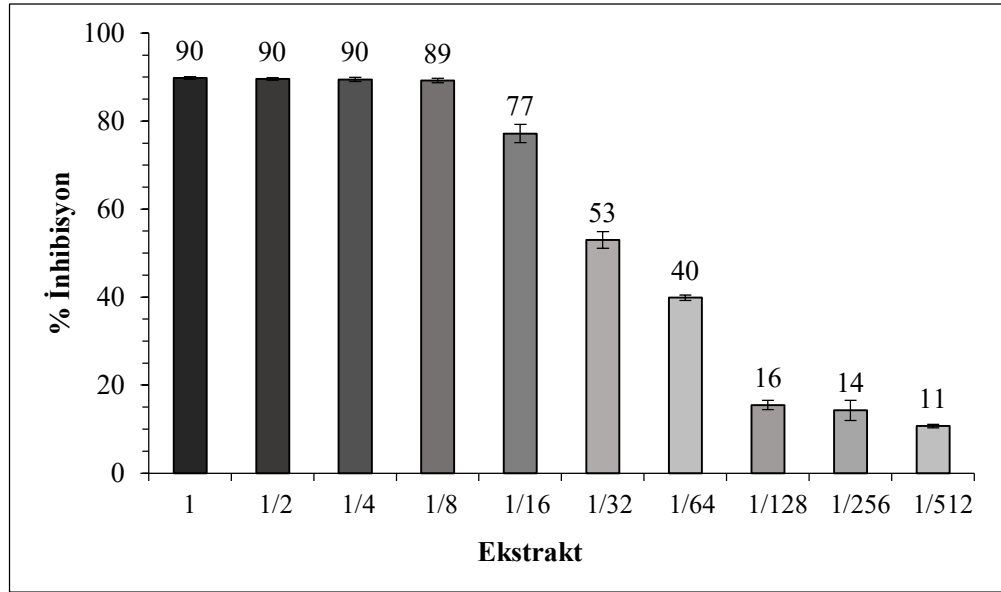
Ekstrakt seyreltme oranı	Karayemiş ekstraktı kuru ağırlık (mg/mL)
1	75.90 ± 14.5
1/2	37.95 ± 7.3
1/4	18.98 ± 3.6
1/8	9.49 ± 1.8
1/16	4.74 ± 0.9
1/32	2.37 ± 0.5
1/64	1.19 ± 0.2
1/128	0.59 ± 0.1
1/256	0.30 ± 0.1
1/512	0.15 ± 0.0

4.3. Karayemiş Yaprak Ekstraktının DPPH Radikali Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi

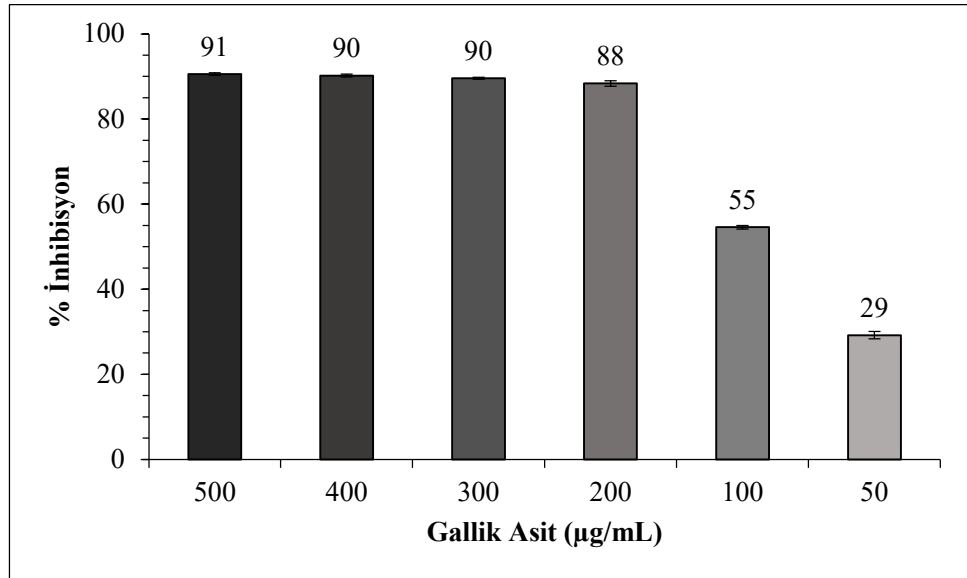
Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) ve gallik asit standartının serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak tespit edildi.

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi karayemiş ekstraktı için direkt uygulamada en yüksek %90 [Şekil 4.1.], gallik asit standardı için ise 500 µg/mL konsantrasyonda %91 olarak belirlendi [Şekil 4.2.].

Ekstraktların DPPH serbest radikali giderim aktivitesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.1: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512) hazırlanan karayemiş ekstraktının DPPH radikalini giderim aktivitesi ile inhibisyon değerleri (%). Barlar üç tekrarlı deneylerin ortalamasını ve standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda (500 µg/mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL) hazırlanan gallik asidin DPPH radikalini giderim etkisi ile inhibisyon değerleri (%). Barlar üç tekrarlı deneylerin ortalamasını ve standart sapmaları göstermektedir.

4.4. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Toplam Fenolik Madde Miktarı

Karayemiş yaprak ekstraktının toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak tespit edildi.

Karayemiş yaprak ekstraktı 1/10 oranında seyreltilerek kullanıldı. Standart olarak gallik asit tercih edildi. Fenolik içeriği standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar gallik asit cinsinden ifade edildi.

Karayemiş yaprak ekstraktının toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden 89.27 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlendi [Tablo 4.2].

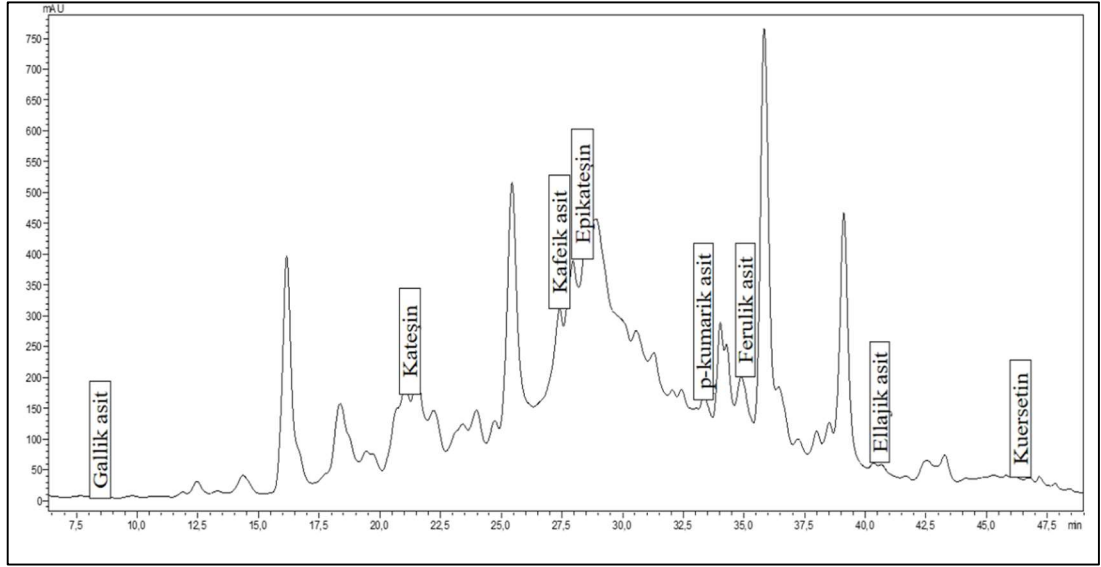
Tablo 4.2: Karayemiş yaprak ekstraktında bulunan toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g ekstrakt). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve $\pm$ standart sapmalar ile belirtildi.

Ekstrakt	Toplam Fenolik İçerik (mg GAE/g ekstrakt)
Karayemiş yaprak (etanol, %70)	89.27 $\pm$ 0.6

4.5. Karayemiş Yaprak Ekstraktının HPLC Yöntemi ile Fenolik Bileşen Tayini

Fenolik bileşenler, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu Nexera 2, Japonya) kullanılarak, analiz edildi.

Karayemiş ekstraktının fenolik bileşenlerden gallik asit (0.631 mg/L), kateşin (34.874 mg/L), kafeik asit (16.562 mg/L), epikateşin (76.954 mg/L), p-kumarik asit (5.06 mg/L) ferulik asit (24.97 mg/L), ellajik asit (2.211 mg/L) ve kuersetin (2.041 mg/L) içerdiği tespit edildi [Şekil 4.3., Tablo 4.3].



Şekil 4.3: Karayemiş yaprağı ekstraktının fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogramı.

Tablo 4.3: Karayemiş yaprak ekstraktının fenolik bileşen karakterizasyonu.

	Galik asit	Kateşin	Kafeik asit	Epikateşin	p-kumarik asit	Ferulik asit	Ellajik asit	Kuersetin
Konsantrasyon (mg/L)	0.631	34.874	16.562	76.954	5.06	24.97	2.211	2.041
RT (Alıkonma süresi, dakika)	8.231	21.041	27.407	27.953	33.346	34.881	40.341	46.093

4.6. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Flavonoid Madde Miktarı

Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) flavonoid madde miktarı alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılarak tespit edildi.

Ekstrakt (etanol, %70) seyreltilmeden kullanıldı. Standart olarak kuersetin (200-500 µg/mL) tercih edildi. Flavonoid içeriği standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar kuersetin cinsinden ifade edildi.

Karayemiş yaprak ekstraktının flavonoid madde miktarı 3.64 mg QE/g ekstrakt olarak belirlendi [Tablo 4.4.].

Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

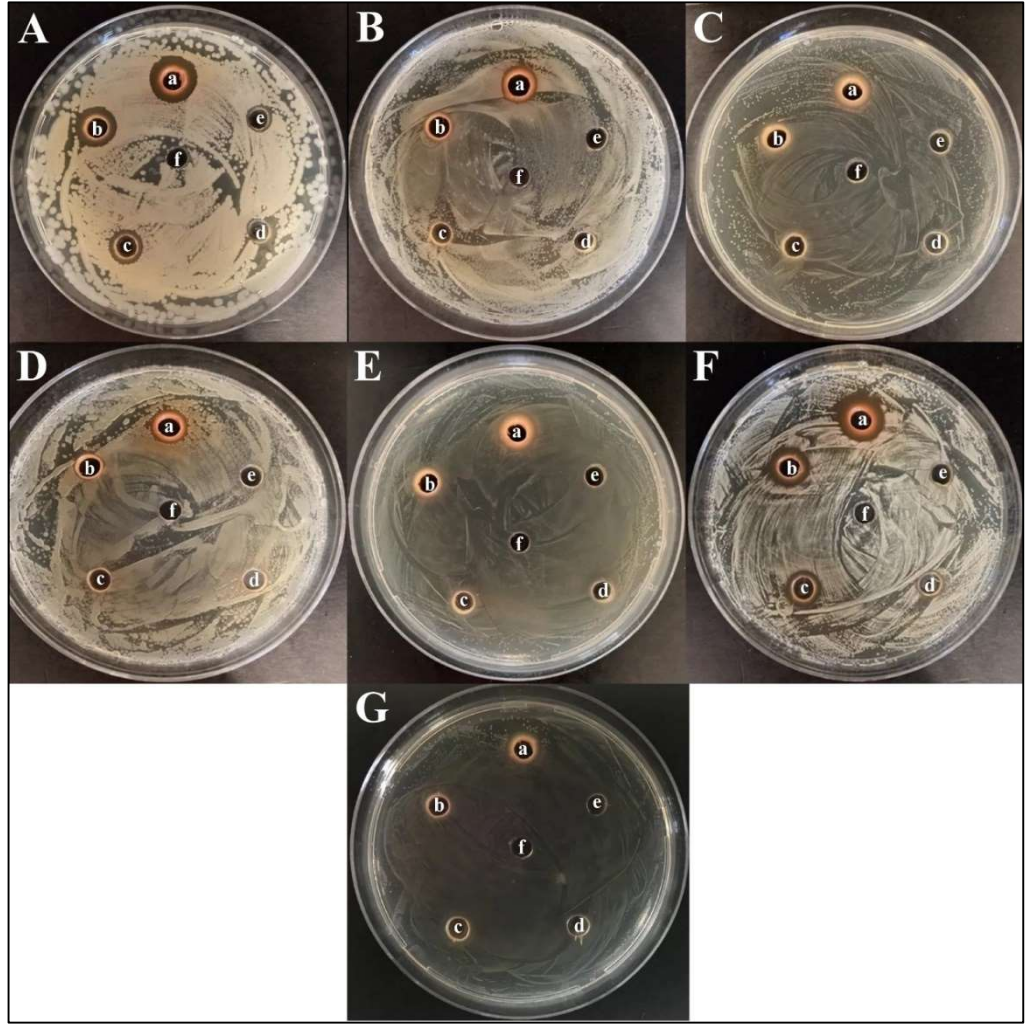
Tablo 4.4: Karayemiş yaprak ekstraktında bulunan flavonoid madde miktarı (mg QE/g ekstrakt). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve $\pm$ standart sapmalar ile belirtildi.

Ekstrakt	Toplam Flavonoid İçerik (mg QE/g ekstrakt)
Karayemiş yaprak (etanol, %70)	3.64 $\pm$ 0.24

4.7. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Antimikrobiyal Etkisi

4.7.1. Ekstraktın Antimikrobiyal Etkinliğinin Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu çalışmada karayemiş meyve ekstraktının antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla Gram pozitif *B. cereus* ATCC 11778 ve Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 suşları üzerinde; yaprak ekstraktının antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla ise Gram pozitif *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. uberis* ATCC 700407 ve Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve *P. syringae* pv.tomato suşları üzerinde agar kuyu difüzyonu deneyi gerçekleştirildi. İnhibisyon zonları kuyu çapı (6 mm) dahil edilerek hesaplandı [Şekil 4.4 ve 4.5].

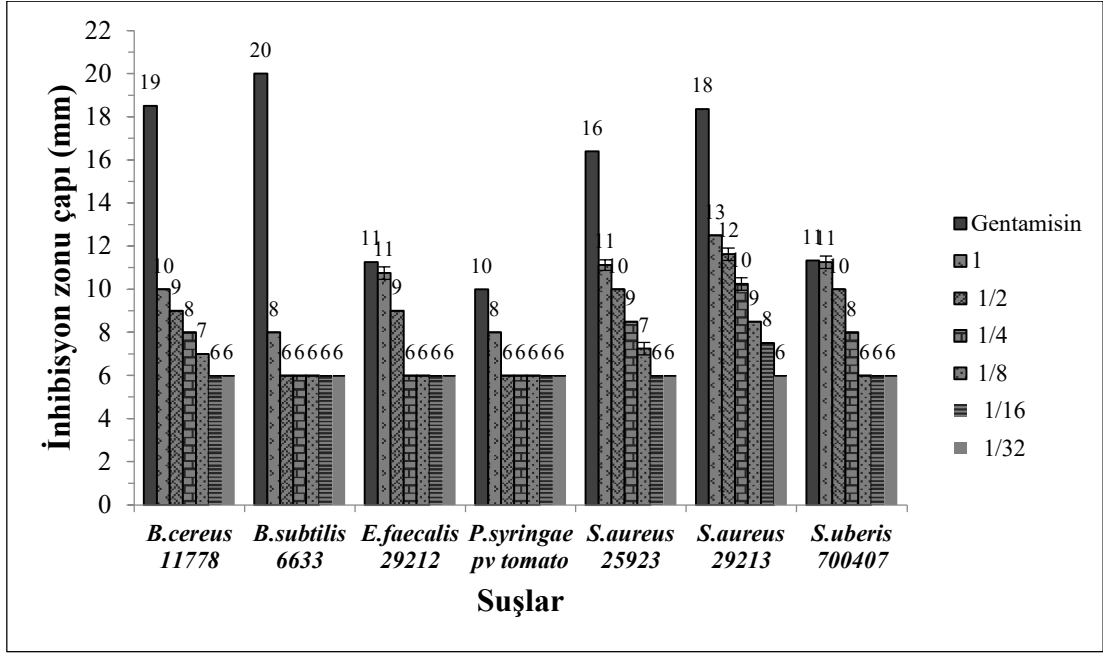


Şekil 4.4: Karayemiş yaprak ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (a: 1 b: 1/2, c: 1/4, d: 1/8, e: 1/16 ve f: 1/32 sulandırma) **A:** *B. cereus* ATCC 11778, **B:** *B. subtilis* ATCC 6633, **C:** *E. faecalis* ATCC 29212, **D:** *P. syringae* pv *tomato*, **E:** *S. aureus* ATCC 25923 **F:** *S. aureus* ATCC 29213 ve **G:** *S. uberis* ATCC 700407 suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisi ile oluşan inhibisyon zonları (mm).

Karayemiş meyve ekstraktlarının (metanol ve etanol) bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisi incelendiğinde inhibisyon zon çapı gözlenmedi.

Karayemiş yaprak ekstraktının (%70, etanol) bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisi incelendiğinde *S. aureus* ATCC 29213 suşu üzerinde en yüksek (13 mm) etkiyi oluşturduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Oluşan inhibisyon zon çapları gentamisin antibiyotiği ile karşılaştırılarak incelendiğinde ekstraktın *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği tespit edildi. *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşlarında gentamisin uygulamasına eş değer sonuçlar (11 mm) saptandı ($p > 0.05$) [Şekil 4.5.].



Şekil 4.5: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının kullanılan suşlar üzerindeki antimikrobiyal etkisi. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

4.7.2. Ekstraktın Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunun Belirlenmesi

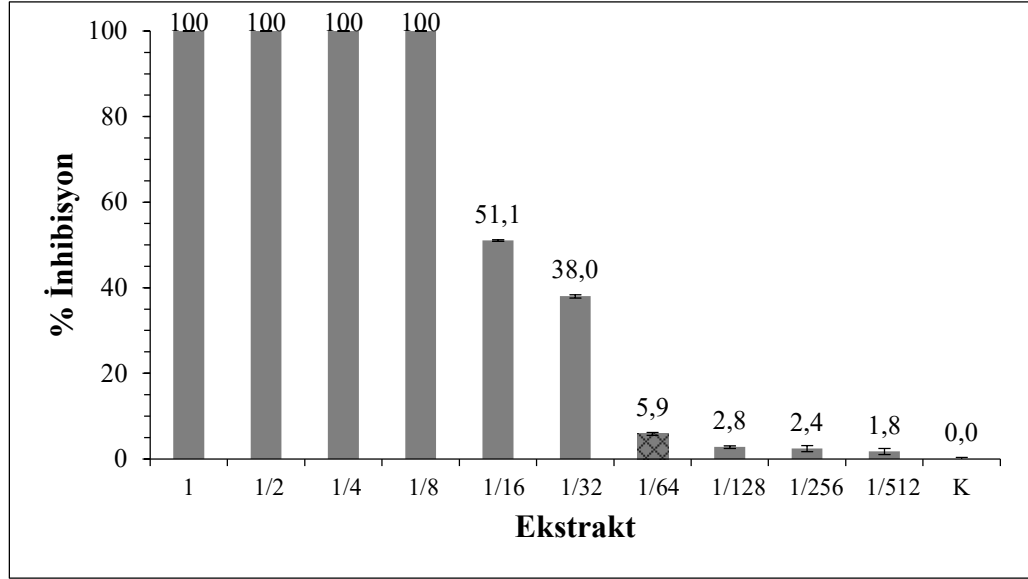
Karayemiş yaprak ekstraktının (etanol, %70) farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512) *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşları üzerindeki inhibe edici etkisi MİK değerleri belirlenerek hesaplandı. Mikroorganizmanın büyümesinin önlendiği en düşük konsantrasyon minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri ile tespit edildi.

Ekstraktın *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerinde MİK değeri %5.9 inhibisyon oranı ile 1.2 mg/mL (1/64) olarak belirlendi. Bakterisidal etkinliğin ise 9.5 mg/mL (1/8) konsantrasyona kadar devam ettiği gözlemlendi [Şekil 4.6, Tablo 4.5]

Ekstraktın *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde MİK değeri %5.1 inhibisyon oranı ile 0.3 mg/mL (1/256) olarak belirlendi. Bakterisidal etkinliğin ise 9.5 mg/mL (1/8) konsantrasyona kadar devam ettiği gözlemlendi [Şekil 4.7, Tablo 4.5]

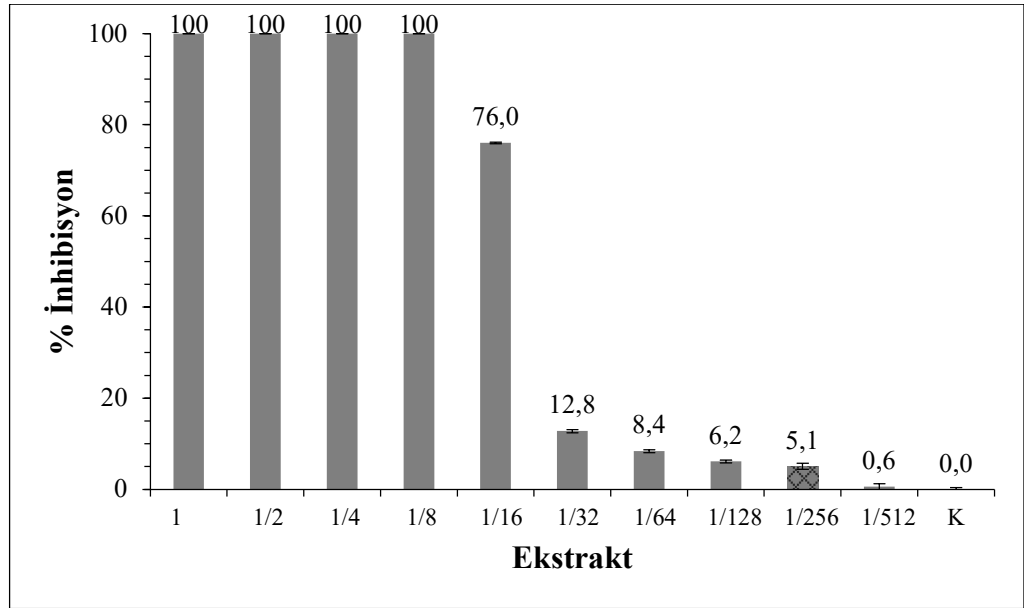
Ekstraktın *S. aureus* ATCC 29213 suşu üzerinde MİK değeri %8.2 inhibisyon oranı ile 1.2 mg/mL (1/64) olarak belirlendi. Bakterisidal etkinliğin 76 mg/mL (1/1) olduğu gözlemlendi [Şekil 4.8, Tablo 4.5]

Ekstraktın *S. uberis* ATCC 700407 suşu üzerinde MİK değeri %3.2 inhibisyon oranı ile 1.2 mg/mL (1/64) olarak belirlendi. Bakterisidal etkinliğin ise 4.7 mg/mL (1/16) konsantrasyona kadar devam ettiği gözlemlendi [Şekil 4.9, Tablo 4.5].

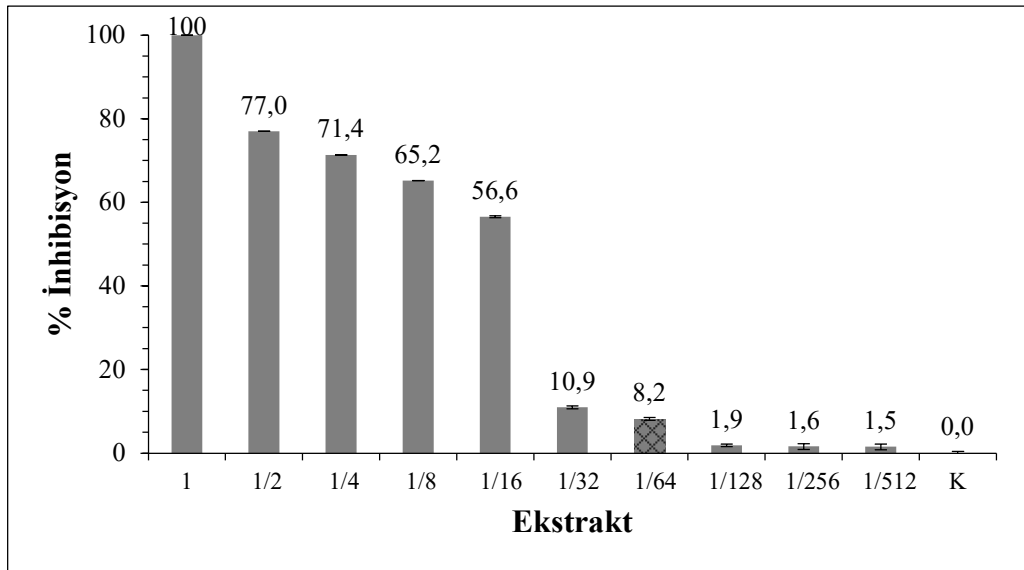


Şekil 4.6: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 ve K: ekstrakt içermeyen kontrol) hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%).

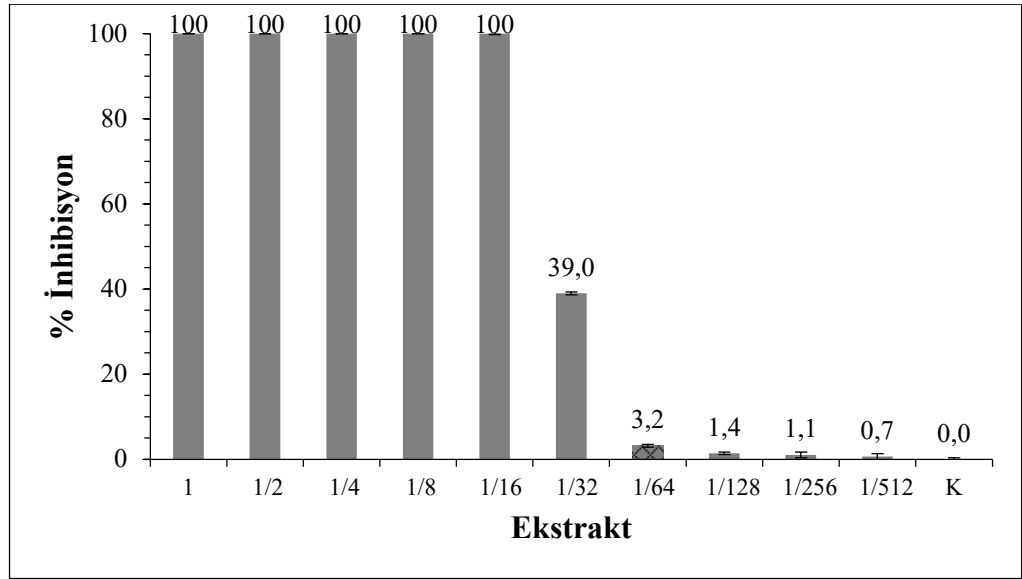
Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.



Şekil 4.7: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 ve K: ekstrakt içermeyen kontrol) hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%). Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.



Şekil 4.8: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 ve K: ekstrakt içermeyen kontrol) hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının *S. aureus* ATCC 29213 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%). Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.



Şekil 4.9: Farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 ve K: ekstrakt içermeyen kontrol) hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktının *S. uberis* ATCC 700407 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (%). Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

Tablo 4.5: Karayemiş yaprak ekstraktının etkisi ile *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. uberis* ATCC 700407 bakterilerinin MİK (mg/mL), %50 (MİK₅₀) ve %70 (MİK₇₀) oranında inhibe olduğu konsantrasyonu (mg/mL) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) (mg/mL) değerleri. (EF: *E. faecalis* ATCC 29212, SA: *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 29213, SU: *S. uberis* ATCC 700407).

	EF 29212	SA 25923	SA 29213	SU 700407
MİK	1.2	0.3	1.2	1.2
MİK₅₀	3.45	3.40	7.07	2.72
MİK₇₀	5.52	5.13	18.36	4.04
MBK	9.50	9.50	75.90	4.70

Ekstraktın *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerinde MİK₅₀ değeri 3.45 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 5.52 mg/mL olarak belirlendi. *S. aureus* ATCC 25923 suşunun MİK₅₀ değeri 3.40 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 5.13 mg/mL olarak gözlenirken, *S. aureus* ATCC 29213 suşunun MİK₅₀ değeri 7.07 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 18.36 mg/mL olarak tespit edildi. *S. uberis* ATCC 700407 suşunda ise MİK₅₀ değeri 2.72 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 4.04 mg/mL olarak belirlendi.

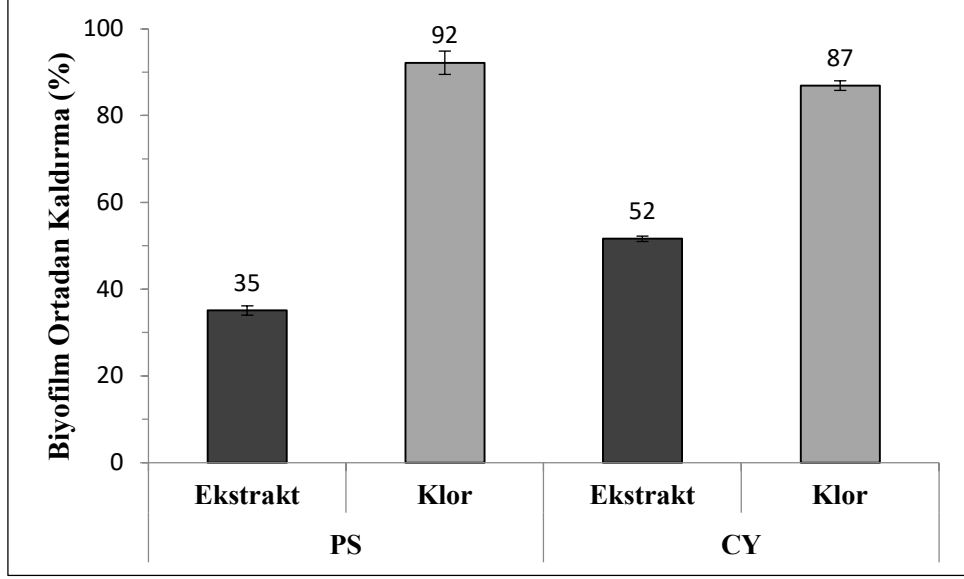
4.8. Karayemiş Yaprak Ekstraktının Antibiyofilm Etkisi

E. faecalis ATCC 29212 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşlarının polistiren ve cam yüzeyde oluşturdukları biyofilmlerin ortadan kaldırılmasında karayemiş yaprak ekstraktının etkisini belirlemek amacıyla öncelikle, TSB (%2 glukoz) besiyerinde 48 saat boyunca 37°C sıcaklıkta bakterilerin inkübasyonu ile biyofilm oluşumu sağlandı. Polistiren yüzey (PS) için 96 kuyulu mikrotitrasyon plakaları, cam yüzey (CY) için ise vida kapaklı cam tüpler tercih edildi.

Oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için 1/8 oranında seyreltilmiş karayemiş yaprak ekstraktı etkisinin karşılaştırılması amacıyla klor solüsyonu (200 ppm, K) kullanıldı.

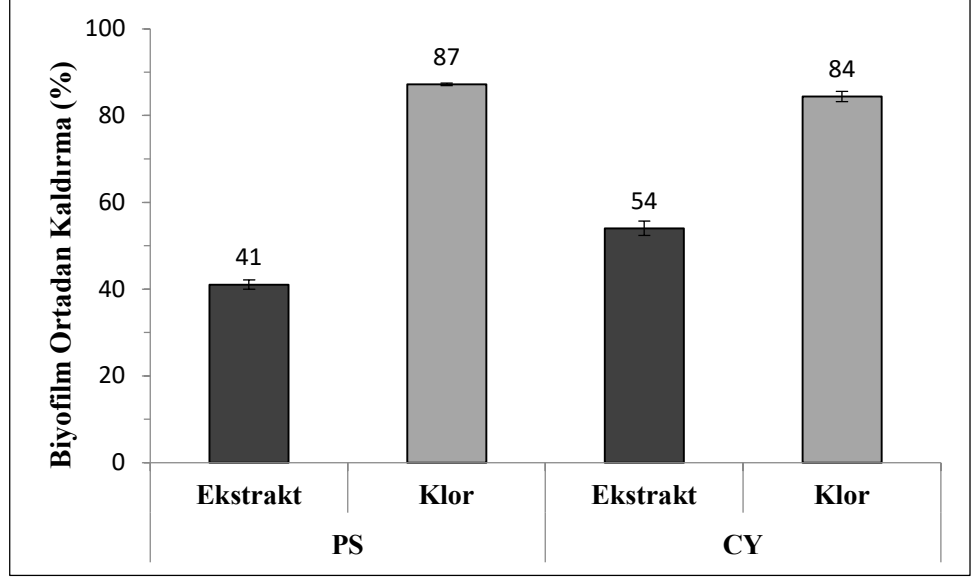
1/8 oranında seyreltilen karayemiş yaprak ekstraktının ve klor solüsyonunun PS (polistiren yüzey) ve CY (cam yüzey) yüzeyde *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşlarının oluşturduğu biyofilmin ortadan kaldırma oranları (%) incelendi.

E. faecalis ATCC 29212 suşunun PS yüzeyde oluşturduğu biyofilmlerin ortadan kaldırma yüzdeleri incelendiğinde ekstrakt uygulamasında %35, klor uygulamasında %92 ortadan kaldırma gözlemlendi. CY yüzeyde oluşturduğu biyofilmlerin ortadan kaldırma yüzdeleri incelendiğinde ise ekstrakt uygulamasında %52, klor uygulamasında %87 ortadan kaldırma tespit edildi [Şekil 4.10].



Şekil 4.10: *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun PS ve CY’de 48 saatlik inkübasyonu ile oluşan biyofilmlerinin karayemiş ekstraktı (1/8) ve klor (200 ppm) uygulanması ile ortadan kaldırılma oranları (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

S. uberis ATCC 700407 suşunun PS yüzeyde oluşturduğu biyofilmlerin ortadan kaldırma yüzdeleri incelendiğinde ekstrakt uygulamasında %41, klor uygulamasında %87 biyofilmlerin ortadan kaldırıldığı gözlemlendi. Aynı bakteri suşunun CY yüzeyde oluşturduğu biyofilmlerin ortadan kaldırma yüzdeleri incelendiğinde ise ekstrakt uygulamasında %54, klor uygulamasında %84 oranında ortadan kaldırma tespit edildi [Şekil 4.11].

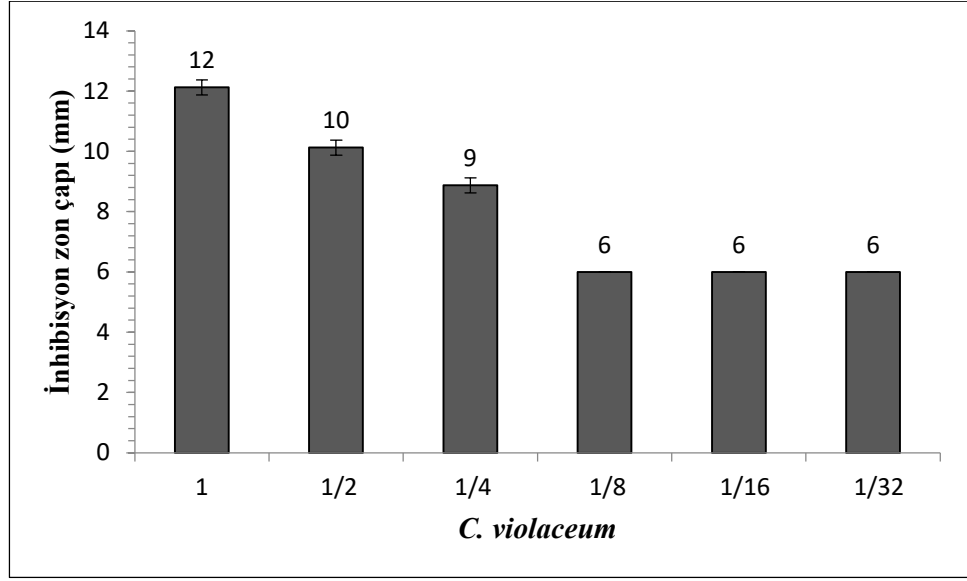


Şekil 4.11: *S. uberis* ATCC 700407 suşunun PS ve CY’de 48 saatlik inkübasyonu ile oluşan biyofilmlerinin karayemiş ekstraktı (1/8) ve klor (200 ppm) uygulanması ile ortadan kaldırılma oranları (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

E. faecalis ATCC 29212 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşlarının oluşturduğu biyofilmleri ortadan kaldırma yüzdeleri incelendiğinde CY yüzeyde en yüksek sonuç *S. uberis* ATCC 700407 suşunda (%54), PS yüzeyde en yüksek sonuç yine *S. uberis* ATCC 700407 suşunda (%41) gözlemlendi. Klor (200 ppm) uygulamasında ise CY yüzeyde en yüksek sonuç *E. faecalis* ATCC 29212 suşunda (%87), PS yüzeyde en yüksek sonuç yine *E. faecalis* ATCC 29212 suşunda (%92) belirlendi.

4.9. Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama)

Karayemiş yaprak ekstraktının (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) *C. violaceum* ATCC 12472 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi agar kuyu difüzyonu yöntemi kullanılarak tespit edildi. İnhibisyon zonları kuyu çapı (6 mm) dahil edilerek hesaplandı. En yüksek inhibisyon zon çapı 12 mm olarak belirlendi [Şekil 4.12].



Şekil 4.12: Karayemiş yaprak ekstraktının farklı seyreltme oranlarında (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ve 1/512) *C. violaceum* ATCC 12472 suşu üzerindeki inhibe edici etkisi (mm). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Son yıllarda, çeşitli kanser türlerinin ve yaşa bağlı hastalıkların önlenmesinde kullanılmak üzere antioksidanlar, antimutajenler ve antikanserojenler büyük ilgi görmektedir. Fenolik bileşiklerin, güçlü anti-enflamatuar ve antinosiseptif aktivitelere sahip olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir [Küpeli vd., 2007]. Bu bağlamda, yüksek oranda fenolik bileşik içeren ve zengin antioksidan bulunduran bitkilere yönelim artmıştır.

Karayemiş ülkemizin doğal florasında yer almakta, yüksek fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi ile insan sağlığına potansiyel fayda sağlamaktadır. Halk arasında çoğunlukla taze meyve olarak tüketilmekle birlikte, kurutularak, salamura edilerek pekmez, reçel, marmelat ve meyve suyu üretiminde kullanılabilir. Bunların yanı sıra, karayemiş meyvesi uzun yıllardır mide ülseri, sindirim sistemi şikayetleri, bronşit, egzama, hemoroid tedavisinde ve idrar söktürücü olarak geleneksel tıp alanında kullanılmaktadır [Baytop, 1984; Hayta, 2015].

Bu tez çalışmasında etanol ve metanol çözücüleri kullanılarak elde edilen karayemiş meyve ekstraktlarının *B. cereus* ATCC 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları üzerinde antimikrobiyal etkileri agar kuyu difüzyonu yöntemiyle araştırılmıştır.

Karayemiş yapraklarından etanol çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktların total DPPH serbest radikali giderme aktivitesi metoduyla antioksidan kapasitesi, Folin-Ciocalteu metoduyla toplam fenolik madde miktarı, alüminyum klorür kolorimetrik metoduyla flavonoid madde miktarı araştırılmıştır. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak fenolik bileşen içeriği aydınlatılmıştır. Agar kuyu difüzyon yöntemi ile *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. syringae* pv.tomato, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşları üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Ekstraktın *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşları üzerinde MİK değerleri tespit edilmiştir. Polistiren (hidrofobik) ve cam (hidrofilik) yüzey kullanılarak *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşları üzerinde antibiyofilm etkisi incelenmiştir. Ekstraktın çoğunluk algılama sinyallerini bloke etmesi *C. violaceum* ATCC 12472 biyosensör suşu ile test edilmiştir. Sonuçlar literatürlerdeki verilerle kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

İstanbul Şile bölgesinden toplanan taze karayemiş yapraklarının (10 g) etanol (%70) çözücüsü kullanarak mikrodalga destekli ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraktın pH değeri 4.7 olarak, kuru ağırlığı ise 75.90 mg/mL olarak belirlenmiştir.

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi karayemiş ekstraktı direkt uygulamasında %90, gallik asit standardında (500 µg/mL) ise %91 olarak gözlenmiştir.

Karayemiş yaprak ekstraktlarının (etanol, %70) toplam fenolik madde miktarı standart olarak kabul edilen gallik asit cinsinden hesaplanmış ve 89.27 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir.

Flavonoid madde miktarı standart olarak kabul edilen kuersetin asit cinsinden hesaplanmış ve 3.64 mg QE/g ekstrakt olarak saptanmıştır.

Karayemiş ekstraktının fenolik bileşenlerden gallik asit (0.631 mg/L), kateşin (34.874 mg/L), kafeik asit (16.562 mg/L), epikateşin (76.954 mg/L), p-kumarik asit (5.06 mg/L), ferulik asit (24.97 mg/L), ellajik asit (2.211 mg/L) ve kuersetin (2.041 mg/L) içerdiği tespit edilmiştir.

Ekstraktın antimikrobiyal etkisi incelendiğinde *B. cereus* ATCC 11778 (10 mm), *B. subtilis* ATCC 6633 (8 mm), *E. faecalis* ATCC 29212 (11 mm), *P. syringae* pv.tomato (10 mm), *S. aureus* ATCC 25923 (11 mm), *S. aureus* ATCC 29213 (13 mm) ve *S. uberis* ATCC 700407 (11 mm) suşlarında inhibisyon zon çapı gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 (6 mm) suşunda ise inhibisyon zon çapı tespit edilememiştir.

Ayrıca, ekstraktın suşlar üzerinde MİK değerleri *E. faecalis* ATCC 29212 1.2 mg/mL, *S. aureus* ATCC 25923 0.3 mg/mL, *S. aureus* ATCC 29213 1.2 mg/mL ve *S. uberis* ATCC 700407 1.2 mg/mL olarak belirlenmiştir.

E. faecalis ATCC 29212 suşunun MİK₅₀ değeri 3.45 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 5.52 mg/mL olarak hesaplanmıştır. *S. aureus* ATCC 25923 suşunun MİK₅₀ değeri 3.40 mg/mL, MİK₇₀ değeri 5.13 mg/mL olarak, *S. aureus* ATCC 29213 suşunun MİK₅₀ değeri 7.07 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 18.36 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *S. uberis* ATCC 700407 suşunda ise MİK₅₀ değeri 2.72 mg/mL, MİK₇₀ değeri ise 4.04 mg/mL olarak saptanmıştır.

MBK değerleri ise *E. faecalis* ATCC 29212 9.50 mg/mL, *S. aureus* ATCC 25923 9.50 mg/mL, *S. aureus* ATCC 29213 75.90 mg/mL ve *S. uberis* ATCC 700407 4.70 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Ekstraktın (1/8 seyreltilmiş) PS yüzeyde *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerinde %35, *S. uberis* ATCC 700407 suşu üzerinde %41, CY yüzeyde ise *E. faecalis* ATCC

29212 suşu üzerinde %52, *S. uberis* ATCC 700407 suşu üzerinde %54 antibiyofilm etkisi gözlenmiştir.

Klor (200 ppm) uygulamasında ise PS yüzeyde *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerinde %92, *S. uberis* ATCC 700407 suşu üzerinde %87, CY yüzeyde ise *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerinde %87, *S. uberis* ATCC 700407 suşu üzerinde %84 antibiyofilm etki belirlenmiştir.

Karayemiş yaprak ekstraktının anti-quorum sensing etkisi incelendiğinde *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda (12 mm) renksiz opak zon çapı tespit edilmiştir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon geleneksel tekniklere göre, daha iyi ekstraksiyon verimi sağlayan yeni ekstraksiyon yöntemlerinden biridir [Wang vd., 2006]. Bu teknik, ekstraktların kalitesini artırırken zaman ve enerji tasarrufu sağlayarak hızlı ekstraksiyona izin vermesiyle gıda ve ilaç endüstrisinin ilgi alanına girmeyi başarmıştır [Hong vd., 2001; Ai vd., 2006; Proestos vd., 2008; Zigoneanu vd., 2008, Routray vd., 2012; Wu vd., 2012].

Önceki çalışmalarda, oksitlenebilir bileşiklerin, mikrodalga destekli ekstraksiyon sırasında oksidasyondan korunabileceğini ve bunun da daha yüksek bir ekstraksiyon verimiyle sonuçlanabileceğini varsayılmıştır [Yu vd., 2009].

Karabegović ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Güney Sırbistan bölgesinden toplanan taze karayemiş yapraklarının (40 g) metanol (400 ml) çözücüsü kullanarak mikrodalga destekli (MWAE), ultrason destekli (UAE), klasik ekstraksiyon (CE) ve Soxhlet aparatı (SE) yöntemleri ile ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimliliği SE ekstraksiyon yönteminde elde edilmiştir ancak bu yöntem sekiz kat daha uzun bir ekstraksiyon süresi gerektirmektedir. MWAE için ekstraksiyon verimliliği %70, UAE için %64 ve CE için %53 olarak belirlenmiştir. Karayemiş yaprağının dört farklı ekstraksiyon metodu kullanılarak elde edilmiş ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı incelenmiştir. Toplam fenolik miktarı MWAE ekstraktında 119.4 mg GAE/g kuru ekstrakt, UAE ekstraktında 114.7 mg GAE/g kuru ekstrakt, CE ekstraktında 116.0 mg GAE/g kuru ekstrakt ve SE ekstraktında 85.4 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak bulunmuştur. Flavonoid madde miktarı MWAE ekstraktında 66.6 mg rutin/g kuru ekstrakt, UAE ekstraktında 64.4 mg rutin /g kuru ekstrakt, CE ekstraktında 63.5 mg rutin/g kuru ekstrakt ve SE ekstraktında 61.3 mg rutin /g kuru ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Birçok araştırmacı, MWAE tekniğinin hem ekonomik ve çevresel nedenlerden dolayı hem de fenolik bileşik etkinliğinden kaynaklı diğer tekniklere kıyasla daha

kabul edilebilir olduğunu doğrulamıştır [Pan vd., 2003; Beejmohun vd., 2007; Casazza vd., 2010; Dhanani vd., 2013].

Orhan ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, Trabzon ilinin Akçaabat ilçesinden toplanan karayemiş yaprak ve meyvelerinin (25 g) diklorometan, etil asetat, aseton, metanol ve distile su çözücülerıyla ekstraksiyonu sağlanmıştır. Karayemiş yaprak ekstraktında toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden, diklorometan çözücüsünde 34.92 mg GAE/g ekstrakt, etil asetat çözücüsünde 46.43 mg GAE/g ekstrakt, aseton çözücüsünde 46.43 mg GAE/g ekstrakt, metanol çözücüsünde 113.45 mg GAE/g ekstrakt, ve distile su çözücüsünde 88.10 mg GAE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Karayemiş meyve ekstraktında ise toplam fenolik madde miktarı diklorometan çözücüsünde 14.63 mg GAE/g ekstrakt, etil asetat çözücüsünde 27.67 mg GAE/g ekstrakt, aseton çözücüsünde 45.25 mg GAE/g ekstrakt, metanol çözücüsünde 64.63 mg GAE/g ekstrakt, ve distile su çözücüsünde 32.83 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir.

Halilova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada Trabzon ilinden topladıkları sekiz farklı genotipteki karayemiş meyvelerinin metanol çözücüsüyle ekstraksiyonu sağlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı en düşük 24.36 mg GAE/g ekstrakt ve en yüksek 58.46 mg GAE/g ekstrakt olarak bulunmuştur.

Özkan ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışmada etanol (%80) çözücüsüyle hazırlanan karayemiş yaprak ekstraktında toplam fenolik madde miktarı 17.62 mg GAE/g ekstrakt, flavonoid madde miktarı kateşin cinsinden 11.61 mg CE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Karayemiş su ekstraktında toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden 0.83 mg GAE/g ekstrakt, flavonoid madde miktarı 0.47 mg CE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Celep ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada Balıkesir ilinden toplanan karayemiş meyve (metanol, %80) ekstraktında toplam fenolik madde miktarı 23.64 mg GAE/g ekstrakt, flavonoid madde miktarı ise 16.87 mg QE/g ekstrakt olarak tanımlanmıştır.

Çalışmalar incelendiğinde, bitkilerin çözücülere göre fenolik madde içeriğinde farklılıklar meydana geldiği açıkça görülmektedir [Arıdurdu vd., 2013]

Birçok çalışma, yaprak ekstraktlarının aynı bitkinin diğer kısımlarına göre daha yüksek fenolik bileşik konsantrasyonlarına sahip olduğunu göstermiştir [Stanković, 2002; Vagiri vd., 2012; Belkhir vd., 2013]

Çalışmadaki bulgular literatür ile karşılaştırıldığında karayemiş yaprak (etanol, %70) ekstraktının toplam fenolik madde miktarı Orhan ve arkadaşlarının (2011) diklorometan, etil asetat, aseton ve distile su çözücülerini kullanarak gerçekleştirdiği karayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Metanol çözeltisi kullanılarak yapılan meyve ve yaprak ekstraktları karşılaştırıldığında ise fenolik madde miktarının meyve ekstraktına göre daha yüksek olduğu gözlenirken yaprak ekstraktına göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

Halilova ve arkadaşları (2010) ile Celep ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmalar incelendiğinde karayemiş meyve metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarının bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı Özkan ve arkadaşlarının (2023) karayemiş yaprak (etanol, %80) ekstraktı ile karşılaştırıldığında ise bu tez çalışmasında kullanılan karayemiş yaprak (etanol, %70) ekstraktında çok daha yüksek sonuç elde edilmiştir.

Birçok araştırmacı antioksidan aktivite ile toplam fenolik ve flavonoid bileşikler arasında doğrusal korelasyon bulunduğunu bildirmiştir [Xu vd., 2007; Kalia vd., 2008; Tamuly vd., 2013].

Literatür karşılaştırması yapıldığında, karayemiş yaprak (etanol, %70) ekstraktının flavonoid madde miktarı Celep ve arkadaşlarının (2012) karayemiş meyve (metanol, %80) ekstraktına kıyasla daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Bitki materyalleri ve ekstraksiyon tekniklerinden bağımsız olarak, karayemiş yaprağı ve meyve ekstraktlarındaki en yaygın bileşen klorojenik asit (25.44 - 36.49 mg/g kuru ekstrakt) olarak tanımlanmıştır [Karabegović vd., 2013]

Ayaz ve arkadaşları (1997) ise GC-MS analizine dayalı olarak yaptıkları çalışmada vanilik asidi bütün karayemiş türlerinde ana fenolik asit olarak değerlendirmiştir.

Karabegović ve arkadaşları (2014) karayemiş yapraklarında klorojenik asit (30.44 mg/g kuru ekstrakt), o-kumarik asit (0.92 mg/g kuru ekstrakt), quercetin 3-glucoside (0.58 mg/g kuru ekstrakt), luteolin 7-glucoside (22.78 mg/g kuru ekstrakt), apigenin 7-glucoside (7.11 mg/g kuru ekstrakt), kaempferol 3-glucoside (0.51 mg/g kuru ekstrakt) ve naringenin (0.11 mg/g kuru ekstrakt) fenolik bileşiklerini belirlemiştir. Karayemiş meyvesinde ise klorojenik asit (35.21 mg/g kuru ekstrakt), vanilik asit (1.19 mg/g kuru ekstrakt), kafeik asit (1.69 mg/g kuru ekstrakt), rutin (0.98 mg/g kuru ekstrakt) saptanmıştır.

Alasalvar ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada, Giresun ilinden toplanan karayemiş meyvesinde protokateşik asit (1.12 mg/100 g ekstrakt), p-hidroksibenzoik asit (2.38 mg/100 g ekstrakt), klorojenik asit (136.06 mg/100 g ekstrakt), vanilik asit (12.41 mg/100 g ekstrakt), siringik asit (56.15 mg/100 g ekstrakt) ve p-kumarik asit (49.70 mg/100 g ekstrakt) tanımlanmıştır.

Karahalil ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, Trabzon ilinden toplanan karayemiş meyvesinde gallik asit (0.02 mg/100g ekstrakt), kateşin (3.40 mg/100 g ekstrakt), p-kumarik asit (2.55 mg/100 g ekstrakt), siringik asit (1.30 mg/100 g ekstrakt), p-hidroksibenzoik asit (8.34 mg/100 g ekstrakt), klorojenik asit (33.0 mg/100 g ekstrakt) ve vanilik asit (7.69 mg/100 g ekstrakt) tespit edilmiştir.

DPPH yöntemi, ekstraktların antioksidan aktivitesi hakkında temel bilgilerin elde edilmesi için basit ve hızlı bir tarama yöntemi olarak sıklıkla önerilmektedir [Karabegović vd., 2014].

Celep ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada karayemiş meyve (metanol, %80) ekstraktında DPPH serbest radikali giderim aktivitesi en yüksek %55 olarak tanımlanmıştır.

Halilova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada sekiz farklı genotipteki karayemiş meyvesinin antioksidan aktivitesi en düşük %59.19 ve en yüksek 89.86 olarak saptanmıştır.

Sonuçlar bu tez çalışması ile karşılaştırıldığında karayemiş yaprak (etanol, %70) ekstraktının %90 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi ile Celep ve arkadaşlarının (2012) karayemiş meyve (metanol, %80) ekstraktına ve Halilova ve arkadaşlarının (2010) karayemiş meyve çalışmalarına kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Organik asitlerin birçok bakteri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. [Eswarandam vd., 2004; Akbas ve Ölmez, 2007]. pH organik asitleri etkileyen abiyotik etmenlerden biridir.

Gram-negatif bakterilerin genellikle düşük pH'ta Gram-pozitif bakterilere göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir [Ray ve Sandine, 1992]. Bu sebeple pH'ın antimikrobiyal etkiye olumlu katkı sağladığı düşünülmektedir.

Özkan ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışmada etanol (%80) ve su çözücüleri kullanarak ekstraksiyonunu sağladıkları karayemiş yapraklarının (%1-%10 konsantrasyon) *B. cereus* FMC19, *S. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* O157: H7 ATCC 33150

bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *B. cereus* FMC19 için 8.33- 3.33 mm, *S. aureus* ATCC 25923 için 10.33-12.67 mm, *L. monocytogenes* ATCC 19118 için 9.00-18.33 mm, *S. Typhimurium* ATCC 14028 için 7.67-11.67 mm, *E. coli* O157: H7 ATCC 33150 için 8.33 – 10.83 mm inhibisyon zon çapı belirlemişlerdir.

Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında *B. cereus* FMC19 suşunda bu tez çalışmasında kullanılan *B. cereus* 11778 suşuna göre daha yüksek inhibisyon zon çapı gözlenirken, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 inhibisyon zon çapının elde edilen sonuçlarla benzer olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak ekstrakt konsantrasyonu arttırıldığında inhibisyon zonunun arttığı gözlenmiştir.

Ayla ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada Ankara ilinden toplanmış karayemiş meyvesinin (250 g) metanol (400 mL) çözücüsü ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraktın *B. cereus* ATCC 7064, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 10031 ve *S. aureus* ATCC 6538 bakterileri üzerinde agar kuyu difüzyonu ve MİK deneyleri ile antimikrobiyal etkisi saptanmıştır. Çalışma sonucunda, kuyu çapı (10 mm) dahil edilerek *Bacillus cereus* ATCC 7064 için 31 mm, *E. coli* ATCC 8739 için 23 mm, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için 16 mm, *K. pneumoniae* ATCC 10031 22 mm ve *S. aureus* ATCC 6538 için 34 mm inhibisyon zon çapı gözlenmiştir. MİK sonuçları *B. cereus* ATCC 7064 19.5 mg/mL, *E. coli* ATCC 8739 39 mg/mL, *P. aeruginosa* ATCC 27853 156 mg/mL, *K. pneumoniae* ATCC 10031 78 mg/mL ve *S. aureus* ATCC 6538 39 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Biyofilmler, plastik, cam, metal, ahşap, tıbbi implantlar, doku ve gıda ürünleri gibi çeşitli yüzeyler üzerinde oluşabilmektedir [Kokare vd. 2009]. Bakteriyel biyofilmler, atık su arıtım uygulamalarında ve biyoteknolojide olumlu etkiye sahip olsa da [Wolfaardt vd., 1994; Rittmann vd., 2004] hastane enfeksiyonlarının %60'ının biyofilm oluşumundan kaynaklandığı tahmin edilmektedir [Huebner vd., 1994; Archibald vd., 1997; Fridkin vd., 1997; Goldmann vd., 1997]

Biyofilm oluşumu, insanlarda oluşan enfeksiyonun devamlılığı ve tedavide karşılaşılan zorluklar açısından önemlidir [Aydemir, 2018].

Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar da dahil olmak üzere çok sayıda gram-pozitif enfeksiyonun, yüksek düzeydeki doğal dirençleri nedeniyle, mevcut antibiyotik tedavilerine yanıt vermesinin zor olduğu kanıtlanmıştır [O'Toole vd., 2000].

Enterokoklar, cihazla ilişkili enfeksiyonlarda önemli patojenlerdir ve diğer gram pozitif organizmalar gibi, tıbbi implantlarda enterokok biyofilmlerinin oluşumu artan bir klinik sorundur [Barie vd., 1990; Stickler vd., 1993; Venditti vd., 1993; Shay vd., 1995]

E. faecalis, en yaygın çoklu ilaca dirençli hastane patojenlerinden biridir. Çoğunluk algılama (QS) aracılı biyofilm oluşturma yeteneği patojeniteyi daha da şiddetlendirmektedir [Yadav vd., 2022]

Günümüzde özellikle bakteriyel biyofilmleri hedef alan herhangi bir ilaç klinik kullanımda yer almamaktadır. Tek başına antibiyotik tedavisi biyofilm enfeksiyonlarını engellemek için yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda, klinik olarak önemli ve yüksek mortaliteye neden olan *E. faecalis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter spp.* gibi bakterilerin biyofilm oluşumuna ilgi artmıştır.

Biyofilm oluşumunu belirlemede mikrotiter plaka tabanlı sistemler [Christensen vd., 1985] ve test tüpü deneyleri [Christensen vd., 1983] en sık kullanılan model sistemleri arasında yer almaktadır. Model yüzey malzemelerini temsil etmek üzere polistiren yüzey için mikrotitre plakaları, cam yüzey için ise cam tüpler tercih edilmektedir [Pimentel-Filho vd., 2014].

Bakterilerin biyofilm oluşturmalarında biyofilm oluşturalacakları yüzeyin yapısı, hidrofilik veya hidrofobik özellikte oluşu önemlidir. Çalışmalarda mikroorganizmaların hidrofobik özellikteki polistiren yüzeylere hidrofilik yüzeylerden daha hızlı yapışabildikleri rapor edilmiştir [Corpe, 1980; Williams ve Fletcher, 1996; Marques vd., 2007]. Dolayısıyla cam gibi hidrofilik karakterdeki yüzey materyallerinin gıda ile temas eden yüzeylerde kullanımı doğru bir tercih olacaktır.

Lee ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada *Aronia melanocarpa* ekstraktının streptokok bakterilerinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bakteriler 1 dakika süreyle *Aronia* ekstraktına maruz bırakıldığında biyofilm oluşumunun engellendiği öne sürülmüştür. Ayrıca seyreltilmiş *Aronia* ekstraktının, streptokokların önceden oluşturulmuş biyofilmini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. *Aronia*, meyveler arasında yüksek antioksidan içeriğine sahip olduğu ve bakteriyel toksisite olmaksızın antibiyofilm aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Literatür incelemesi yapıldığında, karayemiş yaprak ekstraktlarının *E. faecalis* ve *S. uberis* suşları üzerinde antibiyofilm etkilerinin incelendiği bir çalışma belirlenmemiştir.

Biyofilm geliştirme ve çoğunluk algılama (QS) birbirine bağlı süreçlerdir. Bakterilerde popülasyon yoğunluğu arttığında QS sinyalleri aktive olur ve biyofilmin koordineli bir şekilde olgunlaşmasını sağlar [Solano vd., 2014].

Birçok çalışma bakteriler arasındaki iletişimi sağlayan sinyalleri bloke ederek biyofilm oluşumunun engellenebileceğini ve antibiyotiklere karşı direncin azaltılabileceği göstermiştir [Jiang vd., 2019; Hong vd., 2012]. Doğal bitkilerden veya bitki ekstraktlarından elde edilen polifenoller bakteri üremesini durdurmadan bakteriler arasındaki iletişimi engelleyerek anti-biyofilm etki oluşturmaktadır [Slobodníková vd., 2016; Lu vd., 2019].

Önceki çalışmalar gallik asit, ferulik ve ellajik asitler gibi bazı fenolik asitlerin bakteriler arasındaki çoğunluk algılamayı engelleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir [Lister vd., 2009; John vd., 2017].

Eriş (2011) yaptığı çalışmada Rosaceae ailesine ait *Rosa damascena* (gül) bitkisinden elde ettiği yağ, absolüt ve suyun *C. violaceum* 12472, *C. violaceum* VIR07 ve *C. violaceum* CV026 suşları üzerinde quorum sensing etkisini araştırmıştır. Bu çalışma sonucunda kullanılan indikatör mikroorganizmalarda gül yağı ve absolütün çevreyi algılama mekanizması üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Önem ve arkadaşlarının (2021) yaptığı çalışmada Rosaceae ailesine ait *Prunus avium* L. (kiraz) meyve sapı ekstraktlarının bakteriler üzerindeki anti-quorum sensing etkisi incelenmiştir. Ekstraktın bakteriler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisine sahip olduğunu gösterilmiştir.

Literatür taramasında benzer bir çalışmaya rastlanmadığından karayemiş yaprak ekstraktlarının anti-quorum sensing aktiviteleri ile elde edilen veriler önemlidir.

Sonuçlarda gözlenen farklılıklar, ekstraksiyon koşulları, ekstraksiyon çözücüsünün türü, ağaçların yaşı, meyvenin olgunluk düzeyi, yağış miktarı, toprak yapısı gibi çevresel faktörler, hasat sonrası koşullar veya depolamadaki farklılıklar ile açıklanabilir [Kolaylı vd., 2003].

Literatürde yer alan birçok çalışmada karayemiş türlerinde bulunan fenolik bileşenlerin antibakteriyel, antioksidan ve antikarsinogenik aktivitelere sahip bir bileşik olduğu bilinmektedir [Meng vd., 2013].

Karayemiş yapraklarının yüksek antioksidan aktivite ve yüksek fenolik bileşik içeriği sebebiyle enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklere alternatif olabilecektir. Sağlık, gıda, kozmetik ve farmasötik ürünlere katılabilecek ucuz, çevreyle dost ve doğal bir antimikrobiyal/antibiyofilm ajan olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abe K., Shimizu S., Tsuda S., Sato T., (2017), "A novel non prophage(-like) gene-intervening element within gerE that is reconstituted during sporulation in *Bacillus cereus* ATCC10987", Scientific reports, 7(1), 11426.
- Aguş N., Sarıca A., Özkalay N., Cengiz A., (2006) "Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnci", ANKEM Derg, 20(3): 145-7. 2.
- Ai Z., Quo J., Wang Y., Liu Y., Zhao, Q. (2006), "Microwave-assisted extraction technique of apple polyphenols in apple pomace", Nongye Gongcheng Xuebao, Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 22(6), 188-191.
- Akbas M., Olmez H., (2007), "Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids", Letters in Applied Microbiology, 44: 619-624.
- Alasalvar C., Al-Farsi M., Shahidi F., (2005), "Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez", Journal of food science, 70(1), S47-S52.
- Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A., (2010), "Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler", Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 26(4), 401-409.
- Alpınar, K., Yazıcıoğlu E., (1991), 9. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı bildirisi.
- Alzoreky N., Nakahara K., (2003), "Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia", International journal of food microbiology, 80(3), 223-230.
- Annous BA., Fratamico PM., Smith JL (2009), "Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do", J Food Sci, 74, 24-37.
- Archibald L., Gaynes R., (1997), "Hospital-acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons", Infectious disease clinics of North America, 11(2), 245-255.
- Arıdur R., Arabacı G., (2013), "Çiğertaze otu (*Salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi", Sakarya University Journal of Science, 17(2), 241-246.
- Aydemir, D., (2018), "Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri", Turkish Journal of Life Sciences, 3(1), 218-230.
- Bagamboula C., Uyttendaele M., Debevere, J., (2003), "Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*", Journal of Food Protection, 66(4), 668-673.

Bakkiyaraj D., Nandhin, J., Malathy B., Pandian S., (2013), “The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum L.*) extract against human bacterial and fungal pathogens”, *Biofouling*, 29(8), 929-937.

Barie P., Christou N., Dellinger E., Rout W., Stone H., Waymack J., (1990), “Pathogenicity of the enterococcus in surgical infections”, *Annals of surgery*, 212(2), 155.

Barnes A., Cerovic V., Hobson P., Klavinskis L., (2007), “*Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen”, *European journal of immunology*, 37(6), 1538–1547.

Bassler B., (1999), “How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing”, *Current opinion in microbiology*, 2(6), 582-587.

Baytop T., (1984), “Therapy with Medicinal Plants in Turkey”, p. 480 (Past and Present), Publications of the Istanbul University. No.3255, Istanbul.

Beejmohun V., Fliniaux O., Grand É., Lamblin F., Bensaddek L., Christen P., Mesnard F., (2007), “Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed”, *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 18(4), 275-282.

Belkhir M., Rebai O., Dhaouadi K., Sioud B., Amri M., Fattouch S. (2013), “Antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian azarole (*Crataegus azarolus L.*) leaves and fruit pulp/peel polyphenolic extracts”, *International Journal of Food Properties*, 16(6), 1380-1393.

Beuchat L., (2001), “Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials”, *Microbial food contamination*, 149-169.

Blois M., (1958), “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, 181, 1199-1200.

Bravo L., (1998), “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”, *Nutr Rev.* 56:317– 333.

Cammorata G., Lanaro G., Bibbo S., Gasbarriai A., (2014), “Gut microbiota modulation; probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?” *International Journal of Emergency Medicine* 9: 365-373.

Casazza A., Aliakbarian B., Mantegna S., Cravotto G., Perego P., (2010), “Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques”, *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50-55.

Celep E., Aydın A., Yesilada E., (2012), “A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible fruits: Cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel”, *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3329-3335.

Cemeroğlu B., Yemenicioğlu A., Özkan M., (2004), “Meyve ve sebzelerin bileşimi”, Meyve ve sebze işleme teknolojisi, 1, 1-188.

Chandan R., Kilara A., (2015), “Dairy-based ingredients”, Dairy Processing and Quality Assurance, 197.

Christensen G., Simpson W., Bisno A., Beachey E., (1983), “Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*”, Infection and Immunity, 40(1), 407-410.

Christensen G., Simpson W., Younger J., Baddour L., Barrett F., Melton D., Beachey E., (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.

Corpe W., (1980), “Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces”, Adsorption of microorganisms to surfaces, 105-144.

Costerton J., Geesey G., Cheng K., (1978), “How bacteria stick”, Scientific American, 238(1), 86-95.

Çetinbaş S., Kemeriz F., Göker G., Biçer İ., Velioğlu Y., (2017), “İnsan Mikrobiyomu: Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkileri”, Akademik Gıda, 15(4), 409-415.

Deveci H.A., Nur G., Kırpık A., M., Harmankaya A., Yıldız, Y., (2016), “Fenolik bileşik içeren bitkisel antioksidanlar, “Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(1), 26-32.

Dhanani T., Shah S., Gajbhiye N., Kumar S., (2013), “Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withaniasomnifera*”, Arab. J. Chem. (in press).

Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L., (2002), “Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation”, Applied and Environmental Microbiology, 68(6), 2950–2958.

Dogantekin E., Ak S., (2015), “Klinik Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* İzolatlarında Daptomisin Etkinliğinin İncelenmesi”, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi.

Dursun S., (2010), “Karayemişte (*Prunus laurocerasus L.*) siyanür içelikli amigdalın ve prunasın miktarlarının belirlenmesi”, (Yüksek lisans tezi, Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Ekici L., Sağdıç O., Kesmen Z., (2006), “Gıda endüstrisinde alternatif bir dezenfektan: ozon”, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 1, 47-57.

Erbek S., Özakin C., Gedikoğlu S., (2002), “Enterokok suşlarında saptanan yüksek düzeyli aminoglikozid ve glikopeptid direnci”, Hastane İnfek Derg, 6: 142-9.

Erdoğan E., Everest A., (2013), “Antimicrobial activities of aqueous extracts and essential oils of two endemic species from Turkey”, Indian Journal of Traditional Knowledge 12 (2): 221-224.

Eriş R., (2011), “Gül (*Rosa damascena mill.*) yağı, absölütü ve gül suyunun *chromobacterium violaceum* atcc 12472, cv026 ve cvır 07 suşlarının çevreyi algılama sistemleri (quorum sensing) üzerine etkisinin araştırılması”, (Doktora tezi, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü).

Eryıldız C., Bukavaz Ş., Gürçan Ş., Hatipoğlu O., (2017), “Mikrobiyoloji laboratuvarlarında nadir izole edilen bir etken: *Streptococcus uberis* [A rarely isolated bacterium in microbiology laboratories: *Streptococcus uberis*]”, Mikrobiyoloji bülteni, 51(2), 171–176.

Eswaranandam S., Hettiarachchy N., Johnson M., (2004), “Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, O157:H7, and *Salmonella*” Gaminara, Journal of Food Science, 69: 79-84

Fridkin S., Welbel S., Weinstein R., (1997), “Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit”, Infectious disease clinics of North America, 11(2), 479-496.

Garrett T., Bhakoo M., Zhang Z., (2008), “Bacterial adhesion and biofilms on surfaces”, Progress in natural science, 18(9), 1049-1056.

Gün İ., Ekinci FY., (2009), “Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam”. GIDA, 34, 165-173.

Granum P., Lund T., (1997), “*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins”, FEMS microbiology letters, 157(2), 223–228.

Goldmann D., Huskins W., (1997), “Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide”, Clinical infectious diseases, 24 (Supplement_1), S139-S145.

Halilova H., Ercisli S., (2010), “Several physico-chemical characteristics of cherry laurel (*Laurocerasos officinalis Roem*) Fruits”, Biotechnology, Biotechnological Equipment, 24(3), 1970-1973.

Hamidi S., (2013), “Bazı sentetik kimyasal maddelerin ve doğal ekstraktların antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktivitelerinin araştırılması”, (Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M., (2011), “Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates”, Braz J Infect Dis, 15, 305-311.

Hayta S., (2015), “Composition of the essential oil of *Laurocerasus officinalis* from Turkey”, *Agric Sci Res J*, 5(12), 215-217.

Higgins D., Dworkin J., (2012), “Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation”, *FEMS microbiology reviews*, 36(1), 131–148.

Høiby N., (2017), “A short history of microbial biofilms and biofilm infections”, *Apmis*, 125(4), 272-275.

Hong N., Yaylayan, V., Vijaya R., Paré J., Bélanger J., (2001), “Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed”, *Natural product letters*, 15(3), 197-204.

Hong S., Hegde M., Kim J., Wang X., Jayaraman A., Wood T., (2012), “Synthetic quorum-sensing circuit to control consortial biofilm formation and dispersal in a microfluidic device”, *Nature communications*, 3(1), 613.

Huebner J., Pier G., Maslow J., Muller E., Shiro H., Parent M., Goldmann D., (1994), “Endemic Nosocomial Transmission of *Staphylococcus epidermidis* Bacteremia Isolates in a Neonatal Intensive Care Unit over 10 Years”, *Journal of Infectious Diseases*, 169(3), 526-531.

Ichinose Y., Taguchi F., Mukaihara T., (2013), “Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*”, *J Gen Plant Pathol*, 79 (5): 285–296.

Janisiewicz WJ., Marchi A., (1992), “Control of Storage Rots on Various Pear Cultivars with a Saprophytic Strain of *Pseudomonas syringae*”, *Plant Disease*, 76 (6): 555–60.

Jansřtova’ B., Lukasřova’ J., (2001), “Heat Resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow’s milk and farm environment”, *Acta Vet Brno* 70, 179–184.

Jiang Q., Chen J., Yang C., Yin Y., Yao K., (2019), “Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases”, *BioMed Research International*, 2019.

John K., Bhagwat A., Luthria D., (2017), “Swarm motility inhibitory and antioxidant activities of pomegranate peel processed under three drying conditions”, *Food chemistry*, 235, 145-153.

Kalia K., Sharma K., Singh H., Singh B., (2008), “Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10129-10134.

Karabegović I., Stojičević S., Veličković D., Todorović Z., Nikolić N., Lazić M., (2014), “The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts”, *Industrial Crops and Products*, 54, 142-148.

Karab y k F., Aysan Y., (2019), “Bazı bitki ekstraktlarının *Pseudomonas syringae* pv. tomato’nun neden olduğu domates bakteriyel benek hastalığına antibakteriyel etkisi”, Tekirdaė Ziraat Fakültesi Dergisi, 16(2), 231-243.

Karahalil F., Şahin H., (2011), “Phenolic composition and antioxidant capacity of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem) sampled from Trabzon region, Turkey”, African Journal of Biotechnology, 10(72), 16293-16299.

Kartal M., Ekinci, M., Poyraz B., (2021), “Biyofilm Yapısı ve  nlenmesi”, Akademik Gıda, 19(3), 353-363.

Keskin D., Toroėlu S., (2011), “Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Bakterilerin Gelişmesini Engelleyen Tıbbi Bitkiler ile Bunların Ekstraktları ve Uçucu Yağları”, Academic Food Journal/Akademik GIDA.

Kırca A., Bilişli A., Demirel N., Turhan H., Arslan E., (2007), “Çanakkale florasındaki bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri”, T B TAK Proje No: 104 0 292, Çanakkale.

Kim, H. O., Park, S. W., Park, H. D. (2004). “Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot.” Food Microbiology, 21(1), 105-110.

Knetsch M., Koole L., (2011), “New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles”, Polymers, 3(1), 340-366.

Kokare CR, Chakraborty S, Khobade A., Mahadik K., (2009), “Biofilms: Importance and Applications”, Indian J Biotechnol, 8: 159-168

Kolaylı S., K   k M., Duran C., Candan F., Din er B. (2003), “Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem (cherry laurel) fruit grown in the Black Sea region”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(25), 7489-7494.

Kris-Etherton P., Hecker K., Bonanome A., Coval S., Binkoski A., Hilpert K., Etherton T., (2002), “Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer”, The American journal of medicine, 113(9), 71-88.

K peli E., Yesilada E., (2007), “Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures”, Journal of ethnopharmacology, 112(3), 524-530.

Lee H., Oh S., Hong S., (2020), “Inhibition of streptococcal biofilm formation by Aronia by extracellular RNA degradation”, Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(4), 1806-1811.

Lee J., Bae Y., Lee S., Lee S., (2015), “Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer”, Journal of food science, 80(10), M2279-M2286.

Lemay M., Choquette J., Delaquis P., Gariépy C., Rodrigue N., Saucier L., (2002), “Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model”, *International Journal of Food Microbiology*, 78(3), 217-226.

Lister P., Wolter D., Hanson N., (2009), “Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms”, *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582-610.

Lu L., Hu W., Tian Z., Yuan D., Yi G., Zhou Y., Cheng Q., Zhu J., Li M., (2019), “Developing natural products as potential anti-biofilm agents”, *Chinese Medicine*, 14(1), 1–17.

Marques S., Rezende J., Alves L., Silva B., Alves E., Abreu L., Piccoli R., (2007), “Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 538-543

Mbega E., Mortensen C., Mabagala R., Wulff E., (2012), “The effect of plant extracts as seed treatments to control bacterial leaf spot of tomato in Tanzania”, *Journal of General Plant Pathology*, 78, 277-286.

McManus P., Stockwell V., Sundin G., Jones A., (2002), “Antibiotic use in plant agriculture”, *Annual review of phytopathology*, 40(1), 443-465.

Meng S., Cao J., Feng Q., Peng J., Hu Y., (2013). “Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review”, *Evidence-based complementary and alternative medicine, eCAM*, 2013.

Mishra R., Panda A., De Mandal S., Shakeel M., Bisht S., Khan J., (2020), “Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens”, *Frontiers in Microbiology*, 11, 2640

Mishra K., Ojha H., Chaudhury N., (2012), “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results”, *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.

Morton L., Caccetta R., Puddey I., Croft K., (2000), “Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease”, *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 27(3), 152-159.

Nasar-Abbas S., Halkman A., (2004), “Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens”, *International journal of food microbiology*, 97(1), 63-69.

Nataro J., Kaper J., (1998), “Diarrheagenic *Escherichia coli*”, *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201.

Neilson A., Goodrich K., Ferruzzi M., (2017), “Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods”, *In Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* (pp. 301-319).

Nouraldin A., Baddaour M., Harfous A., Essa A., (2016), “Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Alexandria J Med*, 52, 99-105.

Novick R., Geisinger E., (2008), “Quorum sensing in staphylococci,” *Annual review of genetics*, 42, 541-564.

Orhan I., Akkol E., (2011), “Estimation of neuroprotective effects of *Laurocerasus officinalis* Roem (cherry laurel) by in vitro methods”, *Food Research International*, 44(3), 818-822

O'Toole G., Kaplan H., Kolter R., (2000), “Biofilm formation as microbial development”, *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

Önem E., Sarisu H., Özeydin A., Muhammed M., Ak A., (2021), “Phytochemical profile, antimicrobial, and anti-quorum sensing properties of fruit stalks of *Prunus avium* L.”, *Letters in Applied Microbiology*, 73(4), 426-437.

Özkan K., Karadağ A., Sağdıç O., (2023), “Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial Effect, and In Vitro Digestion Process of Bioactive Compounds of Cherry Laurel Leaves Extracts”, *Journal of Agricultural Sciences*, 29(1), 352-361.

Özyurt D., (2005), “Toplam flavonoid miktarının geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile tayini” (Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Pan X., Niu G., Liu H., (2003), “Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves”, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(2), 129-133.

Parihar M., Hemnani T., (2003), “Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity”, *Journal of biosciences*, 28(1), 121-128.

Pendurkar S., Kulkarni P., (1989), “Heat resistance of *Bacillus* spores exposed to food processing conditions”, *Die Nahrung* 34, 177–180.

Pietta P., (2000), “Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.

Pimentel-Filho N., Freitas M., Nogueira G., Mantovani H., Vanetti M., (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.

Pitts B., Hamilton M., Zelter N., Stewart P., (2003), "A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal", *Journal of Microbiological Methods*, 54, 269-276.

Podbielski A., Kreikemeyer B., (2004), "Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci", *Int J Infect Dis*, 8, 81-95.

Prazdnova E., Chistyakov V., Churilov M., Mazanko M., Bren A., Volski A., Chikindas M., (2015), DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933", *Letters in applied microbiology*, 61(6), 549–554.

Proestos C., Komaitis M., (2008), "Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds", *LWT-food science and technology*, 41(4), 652-659.

Raffa R., Iannuzzo J., Levine D., Saeid K., Schwartz R., Sucic N., Young J., (2005), "Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 417-423.

Ray B., Sandine W., (2019), "Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives", In *Food biopreservatives of microbial origin* (pp. 103-136).

Rittmann BE., Nerenberg R., Lee K., Issam N., Gillogly TE., Lehman GE., Adham SS., (2004), "The Hydrogen- Based Hollow-Fiber Membrane Biofilm Reactor (HFMBfr) for Removing Oxidized Contaminants", *Water Sci Technol*, 49/11-12: 223–230.

Routray W., Orsat V., (2012), "Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review", *Food and Bioprocess Technology*, 5, 409-424

Scalzo R., (2008), "Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid", *Food Chemistry*, 107(1), 40-43

Schenck L., Patrick S., Michael G., Bowdish., Dawn M., (2016), "Composition and immunological significance of the upper respiratory tract microbiota", *FEBS Letters* 590:21

Sharma Y., Dua D., Nagar A., Srivastava N., (2016), "Antibacterial activity, phytochemical screening and antioxidant activity of stem of *Nicotiana tabacum*", *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 7(3), 1156.

Sharma Y., Nagar A., Srivastava N., Bala K., (2017), "Antioxidant activity of polyphenolic flavonoid of stem of *Nicotiana tabacum*", *Am J Drug Discov Dev*, 7(1), 25-32.

Shay D., Goldmann D., Jarvis W., (1995), “Reducing the spread of antimicrobial-resistant microorganisms: control of vancomycin-resistant enterococci”, *Pediatric Clinics of North America*, 42(3), 703-716.

Singleton V., Rossi J., (1965), “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Slobodníková L., Fialová S., Rendecková K., Kováč J., Mučaji P., (2016), “Antibiofilm activity of plant polyphenols”, *Molecules*, 21(12), 1717.

Solano C., Echeverz M., Lasa I., (2014), “Biofilm dispersion and quorum sensing”, *Current opinion in microbiology*, 18, 96-104.

Srey S., Jahid I., Ha S., (2013), “Biofilm formation in food industries: A food safety concern”, *Food Control*, 31(2), 572–585.

Stanković M., (2002), “Bioaktivni proizvodi prirodnog porekla”, *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac*, (12), 33-51.

Stickler D., King J., Winters C., Morris S., (1993), “Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms”, *Journal of Infection*, 27(2), 133-135.

Şahin E., (2006), “Bitkisel kaynaklı antimikrobiyallerin gıda kaynaklı bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde etkileri”, (Doctora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Tamuly C., Saikia B., Hazarika M., Bora J., Bordoloi M.J., Sahu O.P., (2013), “Correlation between phenolic, flavonoid, and mineral contents with antioxidant activity of underutilized vegetables”, *Int. J. Veg. Sci.* 19 (1), 34–44.

Tanker N., Koyuncu M., Coşkun M., (2007), “Farmasötik Botanik”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 93:288. Ankara

Temel A., Erac B., (2018), “Bacterial biofilms: detection methods and role in antibiotic resistance,” *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(1), 1-13.

Tendolkar PM., Baghdayan AS., Shankar N., (2003), “Pathogenic Enterococci: new developments in the 21st century,” *Cell Mol Life Sci* 60:2622–36.

Tong S., Davis J., Eichenberger E., Holland T., Fowler V., (2015), “*Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management”, *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603–661.

Topçal F., Dıġrak M., Gündoġan R., (2014), “Topraktan İzole Edilen *Bacillus Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi*”, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 4 (2) (2014) 57-67

Treangen T., Maybank R., Enke S., Friss M., Diviak L., Karaolis D., Koren S., Ondov B., Phillippy A., Bergman N., Rosovitz M., (2014), “Complete Genome Sequence of

the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923”, Genome announcements, 2(6), e01110-14.

Tülüce G., Temelli S., Eyigör A., (2021), “Gıda ortamında hayata tutunma: Bakteriyel çoğunluk algılama”, Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 92(1), 83-94.

Uroz S., Dessaux Y., Oger P., (2009), “Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication”, ChemBioChem, 10(2), 205-216.

Vagiri M., Ekholm A., Andersson S., Johansson E., Rumpunen K., (2012), “An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum* L.)”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(42), 10501-10510.

Venditti M., Biavasco F., Varaldo P., Macchiarelli A., De Biase L., Marino B., Serra P., (1993), “Catheter-related endocarditis due to glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* in a transplanted heart”, Clinical infectious diseases, 17(3), 524-525.

Vermerris W., Nicholson R., (2008), “Biosynthesis of phenolic compounds”, In Phenolic compound biochemistry (pp. 63-149), Springer, Dordrecht.

Wang L., Weller C., (2006), “Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants”, Trends in Food Science Technology, 17(6), 300-312.

Ward P., Holden M., Leigh J., Lennard N., Bignell A., Barron A., Clark L., Quail M., Woodward J., Barrell B., Egan S., Field T., Maskell D., Kehoe M., Dowson C., Chanter N., Whatmore A., Bentley S., Parkhill J., (2009), “Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*” BMC genomics, 10, 54.

Wilderer P., (1989), “Structure and function of biofilms, in structure and function of biofilms”, Characklis, WG, and Wilderer, PA, Eds.

Wilkinson BJ., (1997), Biology. In: Crossley KB, Archer GL, eds. “The staphylococci in human disease”, New York: Churchill Livingstone, 1997:1-38

Williams V., Fletcher M. (1996), “*Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition”, Applied and Environmental Microbiology, 62: 1004.

Wolfaardt GM., Lawrence JR., Robarts RD., Caldwell SJ., Caldwell DE., (1994), “Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community”, Appl Environ Microbiol, 60/2: 434–446.

Wu T., Yan J., Liu R., Marcone M., Aisa H., Tsao R., (2012), “Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design”, Food Chemistry, 133(4), 1292-1298.

Xin X., Kvitko B., He S., (2018), “*Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathoge.”, Nature reviews, Microbiology, 16(5), 316–328.

Xu B., Chang S., (2007), “A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents”, *Journal of food science*, 72(2), S159-S166.

Youdim K., Joseph J., (2001), “A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects”, *Free Radical Biology and Medicine*, 30(6), 583-594.

Yu Y., Chen B., Chen Y., Xie M., Duan H., Li Y., Duan G., (2009), “Nitrogen-protected microwave-assisted extraction of ascorbic acid from fruit and vegetables”, *Journal of separation science*, 32(23-24), 4227-4233.

Yuste J., Fung D., (2003), “Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method”, *Food Microbiology*, 20(3), 365-370.

Zigoneanu I., Williams L., Xu Z., Sabliov C., (2008), “Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method”, *Bioresource technology*, 99(11), 4910-4918.

ÖZGEÇMİŞ

Hazel Arkan 2014 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (%30 İngilizce) bölümünde lisans eğitimine başladı. 2019 yılında lisans eğitimini başarıyla tamamladı. 2020 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.