

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

KEKİK ESANSİYEL YAĞININ ETTE BOZULMA
YAPAN *PSEUDOMONAS* TÜRLERİNİN QUORUM
ALGILAMA SİSTEMİ VE BOZUCU FAALİYETLERİNE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Nur GÜÇ

İstanbul
Eylül-2024

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

KEKİK ESANSİYEL YAĞININ ETTE BOZULMA YAPAN
PSEUDOMONAS TÜRLERİNİN QUORUM ALGILAMA
SİSTEMİ VE BOZUCU FAALİYETLERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Nur GÜÇ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Banu METİN

İstanbul
Eylül-2024

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Banu METİN

Üye Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Üye Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Erhan İÇENER

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Kekik Esansiyel Yağının Ette Bozulma Yapan *Pseudomonas* Türlerinin Quorum Algılama Sistemi Ve Bozucu Faaliyetlerine Etkisi**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Beyza Nur GÜÇ

ÖN SÖZ

Araştırmamın her aşamasında sabır, ilgi, anlayış ve değerli eleştirileri ile beni her zaman destekleyen ve bana yardımcı olan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Banu METİN'e, laboratuvar çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Arş. Gör. Yasemin Ş. KÜÇÜKATA ve Arş. Gör. H. Ebrar KIRTIL'a, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca birçok farklı alanda bana katkısı olan değerli akademisyen hocalarıma, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana hem dost hem yardımcı olan sevgili çalışma arkadaşlarıma ve hayatımın her alanında en büyük destekçim olan ve benden desteklerini esirgemeyen sevgili babam Abdullah GÜÇ, annem Tülin GÜÇ, kardeşlerim Saliha Nur GÜÇ ve Melike Nur GÜÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. 1220439 no'lu proje kodu ile proje bursiyeri olarak destek aldığım TÜBİTAK kurumuna ayrıca teşekkür ederim.

Beyza Nur GÜÇ

İstanbul-2024

ÖZET

KEKİK ESANSİYEL YAĞININ ETTE BOZULMA YAPAN *PSEUDOMONAS* TÜRLERİNİN QUORUM ALGILAMA SİSTEMİ VE BOZUCU FAALİYETLERİNE ETKİSİ

Beyza Nur GÜÇ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu METİN

Eylül, 2024 – 105 Sayfa

Pseudomonas türleri soğuk ortam şartlarında gelişerek proteolitik ve lipolitik aktivite gösterme, kötü tat ve koku oluşturma, pigment salgılama özellikleri nedeniyle çiğ et ve süt gibi birçok gıdanın bozulmasına neden olan aerobik Gram-negatif bakterilerdir. Biyofilm oluşturma ve bakteriyel hareketlilik, soğutulmuş çiğ ette bozulmaya neden olan en önemli bakteri grubu olan *Pseudomonas* türlerinin bozulma ile ilgili aktivitelerinde önemli rol oynar. Bakterilerde gıda bozulma faktörleri genellikle quorum algılama (Quorum Sensing, QS) sistemi tarafından düzenlenir. QS, otoindükleyiciler (AI) adı verilen hücre dışı sinyal moleküllerinin salgılanmasına ve algılanmasına dayanan bir hücreden hücreye iletişim mekanizmasıdır. QS sistemi, otoindükleyici-1 (açıllanmış homoserin laktonlar, AHL) ve otoindükleyici-2 (AI-2) gibi sinyal moleküllerinin algılanması sonucunda biyoluminesans, motilite ve biyofilm üretimi gibi özelliklerin düzenlenmesini sağlar. QS inhibisyonu ile QS mekanizması bozularak; gıdanın bozulması ile ilgili aktiviteler azaltılabilir. Bu çalışmada, etten izole edilen *Pseudomonas* türlerinin bozucu özelliklerinden biyofilm üretimi, bakteriyel hareketlilik ve AI-2 üretimi üzerine kekik (*Thymus vulgaris*) yağının etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak çalışmada kullanılan kekik esansiyel yağının uçucu bileşenleri gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile tanımlanarak kullanılan yağ karakterize edilmiştir. Kekik yağının, etten elde edilen biyofilm ve AI-2 üretim kapasitesi yüksek izolatlar (YK8, YK50, YK107, YB43, YB91) ve referans suşlar (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Pseudomonas fragi* ATCC 4973) üzerindeki minimum

inhibisyon konsantrasyonu (MİK) agar dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra, kekik esansiyel yağının *Pseudomonas* izolatlarının bozucu faaliyetlerine etkisini belirlemek için kekik yağı içermeyen ve 1/2, 1/4, 1/8 alt MİK konsantrasyonlarında kekik yağı içeren örnekler ile analizler yapılmıştır. İzolatların biyofilm oluşum miktarı mikrotitre plakalarda kristal mor (CV) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bakteriyel hareketlilik testi için seğirme, kaynaşma (swarming) ve yüzme hareketleri test edilmiş ve oluşan zon bölgelerinin çapları ölçülmüştür. İzolatların AI-2 aktivitesi, hücre süpernatantlarının AI-2 biyosensörü *Vibrio campbellii* BAA-1117 suşunda sebep olduğu lüminesans vasıtasıyla belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kekik esansiyel yağının ette bozulma yapan *Pseudomonas* izolatlarının hareketliliğini, biyofilm üretimini ve AI-2 aktivitesini önemli ölçüde engellediğini göstermiştir ($p<0,05$). Bu çalışmada kekik esansiyel yağının etten izole edilen bazı *Pseudomonas* türlerinin AI-2 aktivitesi üzerine etkisi literatürde ilk olarak belirlenmiştir. Yapılan analizler kekik yağının etin bozulma sürecinin kontrolünde özellikle *Pseudomonas* türlerine karşı kullanılabilirlik etkili alternatif bir doğal ürün olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ette Bozulma, *Pseudomonas*, Biyofilm, Kekik Yağı, Quorum Algılama

ABSTRACT

EFFECT OF THYME ESSENTIAL OIL ON THE QUORUM SENSING SYSTEM AND SPOILAGE ACTIVITIES OF MEAT SPOILER *PSEUDOMONAS* SPECIES

Beyza Nur GÜÇ

Master, Food Engineering

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Banu METİN

September, 2024 - 105 Pages

Pseudomonas species are aerobic Gram-negative bacteria that cause spoilage of various foods stored at refrigeration temperatures, such as raw meat and milk due to their proteolytic and lipolytic activity, along with their ability to produce off-flavors, odors and pigments. Biofilm formation and bacterial motility play important roles in the spoilage-related activities of *Pseudomonas* species, which are among the main group of bacteria responsible for spoilage in refrigerated raw meat. Bacterial food spoilage factors are typically regulated by the quorum sensing (QS) system. QS is a cell-to-cell communication mechanism based on the secretion and detection of extracellular signaling molecules called autoinducers (AI). The QS system regulates characteristics such as bioluminescence, motility and biofilm production through the detection of signaling molecules like autoinducer-1 (acylated homoserine lactones, AHL) and autoinducer-2 (AI-2). By inhibiting QS, spoilage-related activities can be reduced by disrupting the QS mechanism. This study aimed to investigate the effect of thyme (*Thymus vulgaris*) oil on biofilm production, bacterial motility and AI-2 production in *Pseudomonas* species isolated from meat. In this context, the volatile components of the thyme essential oil used in the study were first identified and characterized using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The minimum inhibitory concentration (MIC) of thyme oil on isolates that have high biofilm and AI-2 production capacity (YK8, YK50, YK107, YB43, YB91) obtained from meat and reference strains (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas fragi* ATCC 4973) was determined using the agar dilution method. Then, to

determine the effect of thyme essential oil on the spoilage activities of *Pseudomonas* isolates, analyses were conducted with samples containing thyme oil at 1/2, 1/4, and 1/8 MIC concentrations, as well as samples without thyme oil. The amount of biofilm formation in the isolates was measured using the crystal violet (CV) method in microtiter plates. For the bacterial motility test, twitching, swarming and swimming motilities were tested, and the diameters of the resulting zones were measured. The AI-2 activity of the isolates was determined by the luminescence caused by the cell supernatants in the AI-2 biosensor *Vibrio campbellii* BAA-1117 strain. The results showed that thyme essential oil significantly inhibited the motility, biofilm production and AI-2 activity of *Pseudomonas* isolates responsible for meat spoilage ($p < 0,05$). This study identified the effect of thyme essential oil on the AI-2 activity of certain *Pseudomonas* species causing meat spoilage for the first time in the literature. The analyses have shown that thyme oil is an effective natural alternative product that can be used to control the spoilage process of meat, particularly against *Pseudomonas* species.

Keywords: Meat Spoilage, *Pseudomonas*, Biofilm, Thyme Oil, Quorum Sensing

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR	xiv
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	
LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1 <i>Pseudomonas</i> Spp.'nin Genel Özellikleri	3
2.2 Bakteriyel Biyofilmler	5
2.2.1 Gıda Endüstrisinde Biyofilm.....	9
2.2.2 Bakteriyel Hareketlilik	12
2.3 Quorum Algılama Sistemi (Quorum Sensing, QS).....	13
2.3.1 <i>Pseudomonas</i> Türlerinde Quorum Algılama Sistemi	15
2.4 Esansiyel Yağlar	17
2.4.1 Kekik Yağı	18

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT	21
3.1 Materyal	21
3.1.1 <i>Pseudomonas</i> İzolatları ve Kontrol Suşları.....	21
3.1.2 Kekik Yağı (<i>Thymus vulgaris</i>).....	22
3.2 Metod.....	22
3.2.1 Stok ve Çalışma Kültürü Hazırlama	22
3.2.2 Kekik Esansiyel Yağının Uçucu Bileşenlerinin Belirlenmesi	23
3.2.3 Kekik Yağının <i>Pseudomonas</i> İzolatları Üzerindeki Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	24
3.2.4 Biyofilm Oluşum Analizi.....	25
3.2.5 Hareketlilik Testleri	26
3.2.6 AI-2 Üretimi.....	27
3.2.7 İstatistiksel Analiz.....	28
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1 Kekik Esansiyel Yağının Uçucu Bileşenleri.....	29
4.2 Kekik Yağının <i>Pseudomonas</i> İzolatları Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	32
4.3 Kekik Yağının <i>Pseudomonas</i> İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerine Etkisi	33
4.4 Kekik Yağının <i>Pseudomonas</i> İzolatlarının Hareketliliği Üzerindeki Etkisi.....	48
4.5 Kekik Yağının <i>Pseudomonas</i> İzolatlarının AI-2 Üretimi Üzerine Etkisi	52
BEŞİNCİ BÖLÜM	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKÇA	61

EKLER.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	86



TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan İzolatların Kodları ve Türleri	21
Tablo 4.1: Kekik Esansiyel Yağına Ait Uçucu Bileşenler	30
Tablo 4.2: Kekik Yağının <i>Pseudomonas</i> Suşları Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerleri (%)	32
Tablo 4.3: Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarında <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Seğirme Hareketi Bölge Çapları (mm)	48
Tablo 4.4: YB 43 Suşunun Seğirme Hareketine Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarının Etkisinin Agarda Görünümü.....	49
Tablo 4.5: Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarında <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Kaynaşma Hareketi Bölge Çapları (mm).....	49
Tablo 4.6: YK 107 Suşunun Kaynaşma Hareketine Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarının Etkisinin Agarda Görünümü.....	50
Tablo 4.7: Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarında <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Yüzme Hareketi Bölge Çapları (mm).....	50
Tablo 4.8: YB 91 Suşunun Yüzme Hareketine Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarının Etkisinin Agarda Görünümü.....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın 15000X Büyütülmüş SEM Görüntüsü	4
Şekil 2.2: Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	7
Şekil 2.3: Timol ve Karvakrolün Kimyasal Yapısı.....	19
Şekil 3.1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Tip Suşunun Nutrient Agarda Koloni Görüntüsü.....	23
Şekil 3.2: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Cihaz Görseli.....	24
Şekil 3.3: Biyofilmlere Bağlanan Boyanın Asetik Asit ile Çözündürülmesinden Sonra Mikrotitre Plakanın Görünümü.....	26
Şekil 4.1: <i>Thymus vulgaris</i> Esansiyel Yağının GC-MS Spektrumu	29
Şekil 4.2: Kekik Yağının <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^T Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi	34
Şekil 4.3: Kekik Yağının <i>P. fragi</i> ATCC 4973 ^T Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	36
Şekil 4.4: Kekik Yağının YK 107 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	38
Şekil 4.5: Kekik Yağının YK 8 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	40
Şekil 4.6: Kekik Yağının YB 43 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	42
Şekil 4.7: Kekik Yağının YK 50 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	44
Şekil 4.8: Kekik Yağının YB 91 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	46
Şekil 4.9: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 50 Suşunun Planktonik Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi	53
Şekil 4.10: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 50 Suşunun AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi	53

Şekil 4.11: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 107 Suşunun Planktonik Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi.....	54
Şekil 4.12: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 107 Suşunun AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	55
Şekil 4.13: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YB 91 Suşunun Planktonik Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi	56
Şekil 4.14: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YB 91 Suşunun AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi	56



KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
AB Broth	: Autoinducer Bioassay (Otoindüktör biyoanaliz besiyeri)
AHL	: Açıl homoserin lakton
AI-2	: Otoindüktör-2
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
CV	: Crystal violet
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GRAS	: Genel olarak güvenli kabul edilen
kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
LB	: Luria- Bertani
LSC	: Light count per second
M	: Molarite
MA	: Marine agar
MB	: Marine broth
mg	: Miligram

MHA	: Mueller-hilton agar
MIK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mo	: Mikroorganizma
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient aroth
OD	: Optik yoğunluk
PQS	: <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
QS	: Quorum sensing
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SEM	: Scanning Electron Microscope
spp.	: Species
TSB	: Tryptic soy broth
v/v	: Hacim/hacim
vb	: Ve benzeri
vd	: Ve diğerleri
w/v	: Ağırlık/hacim
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
ρ	: Para

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Pseudomonas spp. en önemli gıda bozucu bakteriler arasında kabul edilirler (Ercolini vd., 2010). Bu türler özellikle buzdolabı şartlarında etin bozulmasına ve et yüzeyinde biyofilm oluşumuna sebep olan aerobik ve psikrotrofik bakterilerdir (Stellato vd., 2017; Ercolini vd., 2010). Taze ve bozulmuş ette çok sık bulunan ve başlıca *Pseudomonas* türlerden biri olarak kabul edilen *Pseudomonas fragi*, ette en sık rastlanılan aerobik bozulma etmeni olup aynı zamanda iyi bir biyofilm üreticisidir (Ercolini vd., 2010). Özellikle gıda ve et endüstrisinde gıda güvenliği ve kalitesi için önemli bakteri gruplarından biri olan *Pseudomonas* türlerinin, bozucu faaliyetlerinin aydınlatılması ve inhibe edilmesi son derece önemlidir.

Çoklu ilaç direncinin olduğu patojen bakterilerin mevcudiyeti nedeniyle alternatif antimikrobiyal ajanların keşfedilmesi, geliştirilmesi ve kullanılması günümüzde oldukça önemli bir konudur. Öte yandan etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal bileşiklerin geliştirilmesine olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Önemli bir bakteriyel iletişim sistemi olan quorum algılama sistemini inhibe etme özelliğine sahip olan doğal maddeler bakterilerin antimikrobiyal ilaç direncinin ortaya çıkma hızını azaltabilir (Kumar vd., 2015). Dolayısıyla esansiyel yağlar, alternatif kaynaklara karşı herhangi bir direnç geliştirmeden, antimikrobiyal maddelerin kullanımına ve gıda bozulmalarının geciktirilmesine olanak sağlayan önemli alternatif ajanlardan biridir. Buna ek olarak birçok farklı esansiyel yağın, çeşitli bakteri türlerinin virülans faktörleri (biyofilm oluşumu, hareketlilik, antibiyotik, biyoluminesans ve pigment üretimi) üzerindeki etkilerinin araştırılması günümüzde ilgi gören konular arasındadır.

Quorum algılama sistemi ve biyofilm oluşumu gibi bozucu faaliyetlerin engellenmesinde kullanılan doğal antimikrobiallardan biri olan esansiyel yağlarla ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Ancak buzdolabı şartlarında ette bozulmaya neden olan *Pseudomonas* türleri içinde *P. fragi*'nin biyofilm oluşturma ve bozucu özelliklerine esansiyel yağların etkisi hakkında çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. Ayrıca *Pseudomonas bubulae* ve *Pseudomonas kulmbachensis* etten izole edilen ve tanımlanan yeni türler olup, bu türlerin bozucu özellikleri ile ilgili bir

Çalışma ise literatürde yer almamaktadır. Bu nedenlerle tez çalışmasının mevcut bilimsel boşlukları doldurması, *Pseudomonas* türlerinin bozucu özelliklerinin ve quorum algılama sisteminin aydınlatılması ve inhibe edilmesiyle literatüre, bilime ve gıda sanayine önemli katkılar sağlanması beklenmektedir.

Bu tezin amacı ette bozulma yapan *P. fragi*, *P. bubulae* ve *P. kulmbachensis* gibi *Pseudomonas* türlerinin biyofilm, hareketlilik ve quorum algılama sistemi üzerine *Thymus vulgaris* esansiyel yağının etkilerini incelemektir. Bu amaçla etten izole edilen, biyofilm ve AI-2 üretimi yüksek 5 izolat ile referans tip suşların etin bozulmasına etki eden biyofilm oluşturma, bakteriyel hareketlilik ve otoindükleyici-2 (AI-2) aktivite özellikleri incelenmiş ve güçlü antimikrobiyal olarak bilinen kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağının bu özellikler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 *Pseudomonas* Spp.'nin Genel Özellikleri

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* familyasından Gram-negatif, aerobik, psikrotrofik, proteolitik ve polar flagella ile hareket edebilen çubuk şeklinde bakterilerdir (Gritty, 2001). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin metabolik çeşitliliklerini ve strese dayanıklılıklarını bildiren birçok çalışma vardır (Solar Venero vd., 2019; Wang vd., 2018; Martínez-Gil vd., 2013). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas fragi*'nin olumsuz koşullar altında hayatta kalma ve üreme yeteneğini arttırabilecek güçlü stratejilere sahip olduğu tahmin edilmiştir (Zhang vd., 2023). *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen lipaz ve proteaz gibi ekzoenzimlerden proteolitik enzimlerin ısıya karşı dayanıklı olduğu bilinmektedir (Datta ve Deeth, 2001). *Pseudomonas* türlerinin birçoğu antibakteriyel ve antifungal bileşik üretmektedir (Ganeshan ve Manoj Kumar, 2005). Pyosin, birçok *Pseudomonas* cinsi bakteri tarafından sentezlenen protein yapılı, antimikrobiyal bir bakteriyosindir (Kuleasan ve Çakmakçı, 2003; Michel-Briand ve Baysse, 2002). İnsanlarda hastalıklara neden olan, fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının %90'ından fazlası pyosin üretir (Michel-Briand ve Baysse, 2002). Polipropilen yüzeyde *P. aeruginosa*'nın 15000X büyütülmüş SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüsü Şekil 2.1'de verilmiştir.

Pseudomonas spp. buzdolabı şartlarında ve aerobik olarak depolanan et, süt, balık ve diğer taze gıda ürünlerinde bozulmaya neden olan önemli türlerdir (Zhang vd., 2019; Ercolini vd., 2010). Aynı zamanda etin bozulmasının başlıca etkenlerinden kabul edilen *P. fragi*'nin en çok bilinen kaynağı gıdalardır (Ercolini vd., 2010; Labadie, 1999). Düşük sıcaklıklarda ette bozulmaya neden olan *Pseudomonas* türleri arasında en istilacı türlerden biri olan *P. fragi*'nin etteki bozulma davranışının ve etki mekanizmasının incelenmesi bozulma ortamındaki rolünü anlamak açısından önemlidir (Ercolini vd., 2010).



Şekil 2.1: *Pseudomonas aeruginosa*'nın 15000X Büyütülmüş SEM Görüntüsü

Kaynak: Nguyen vd., 2022

Pseudomonas gibi psikrotrofik bakteriler, düşük sıcaklıklarda bile metabolik süreçleri gerçekleştirebilirler (Hebraud vd., 1994). Psikrotrofik *Pseudomonas* türlerinin buzdolabı koşullarında biyofilm oluşturdukları da bilinmektedir (Wickramasinghe vd., 2019). Sıcak (25°C-37°C) ve soğutulmuş ortam şartlarında çiğ et yüzeyinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *Pseudomonas* türleri etin bozulmasına, kontaminasyona ve hijyen sorunlarına neden olmaktadır (Wickramasinghe vd., 2019; Giaouris vd., 2014). Özellikle etin bileşimi, nem ve yağ içeriği, pH gibi çeşitli faktörler çiğ et yüzeyinde *Pseudomonas* türlerinin gelişimini ve biyofilm üretimini destekleyen bir ortam oluşturmaktadır (Wang, 2019; Dickson, 1989). Düşük sıcaklıkta depolanan bozulmuş etin yüzeyinde oluşan mukus tabakası, bakteriyel biyofilm, hücre ve et eksüdasından oluşmaktadır (Wickramasinghe vd., 2019; Gonçaves, Piccoli ve Peres, 2017; Jay, Vilai ve Hughes, 2003). Diğer taraftan insanlarda mikrobiyal enfeksiyonlara neden olduğu bilinen biyofilmler, gıda endüstrisinde ekipmanların hasar görmesine ve tıkanmasına yol açarak gıda güvenliği, kalitesi ve halk sağlığı açısından önemli sorunlar oluşturmaktadır (Miquel vd., 2016; Gün ve Ekinci, 2009).

P. fragi gibi et bozucu bakterilerin et yüzeylerini kolonize etme yeteneği, onlara önemli bir rekabet avantajı sağlamakta ve bakterilerin diğer mikroorganizmalarla rekabette üstünlük kazanmasını mümkün kılmaktadır (Delaquis ve McCurdy, 1990). Buzdolabı şartlarında ette ana mikrobiyotayı oluşturan ve bozulmuş gıdalardan izole edilen *Pseudomonas* türleri; *P. fragi*, *Pseudomonas lundensis*, *Pseudomonas putida*

ve *Pseudomonas fluorescens*'dir (Molin, Ternström ve Ursing, 1986; Shaw ve Latty 1984; Rhodes, 1959). Güncel araştırmalar, çiğ etten izole edilen yeni *Pseudomonas* türlerinin tanımlanması ve literatüre kazandırılmasının yanı sıra, yeni türlerin keşfinin devam ettiğini de göstermektedir. Lick vd. (2020) yaptıkları çalışmada sığır etinden izole edilmiş ve *P. fragi*'nin yakın akrabası olan *P. bubulae*'yi yeni tür olarak tanımlamışlardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise çiğ etten izole edilen *P. kulmbachensis* yeni tür olarak tanımlanmıştır (Lick vd., 2024). Gıda bozulmalarına karşı önlemlerin alınabilmesi adına, gıdalarda bozulmaya neden olan yeni bakteri türlerinin keşfedilmesi ve bu bakterilerin biyofilm, enzim, quorum algılama sinyal molekülleri üretme ve slime oluşturma gibi bozucu faaliyetlerinin anlaşılması ve önlenmesi için uygun stratejilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

2.2 Bakteriyel Biyofilmler

Biyofilmler, biyotik veya abiyotik yüzeylere tutunan ve bu yüzeylerde gelişen, çeşitli mikrobiyal hücrelerden oluşan bakteri topluluklarıdır (Costerton ve Stewart, 2001; Sutherland, 2001). Protein, lipit ve DNA'dan oluşan hücre dışı polisakkaritler (extracellular polymeric substance, EPS) biyofilmin temel unsurudur (Fang, Xu ve Chan, 2002). Biyofilmin yapısını ve mimari formunu oluşturan EPS aynı zamanda 3 boyutlu yapıyı stabilize etmektedir. Biyofilmin yapısı ise su, besin, enzim, sinyal alışverişi ve metabolitlerin atılmasına olanak sağlayan mikrokanallardan oluşmaktadır (Stanley ve Lazazzera, 2004; Costerton vd., 1995). Biyofilm yapısı içindeki bakteriler, dış stres faktörlerine ve antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelere göre daha dirençlidir, çünkü antimikrobiyal ajanlarla teması önleyen veya azaltan bir bariyere sahiptirler (O'Toole, Kaplan ve Kolter, 2000).

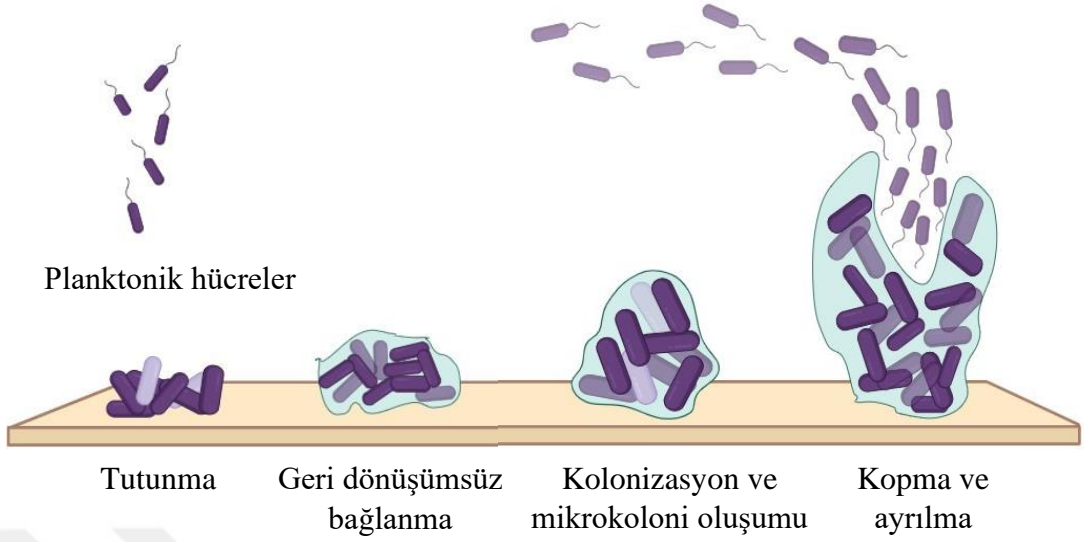
Bakteri, mantar, maya, alg ve virüsler biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalardır (Wingender ve Flemming, 2011). Literatürde *Pseudomonas* cinsi bakterilerin iyi biyofilm üreticileri olduğu bildirilmiştir (Borges vd., 2014). Biyofilm oluşturan diğer bakteri cinsleri; *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Bacillus* şeklinde sıralanabilir (Kocot ve ark., 2017; Gün ve Ekinci, 2009).

Quorum algılama (Quorum Sensing, QS) ve biyofilm oluşturma mekanizmaları birbiriyle bağlantılıdır (Solano vd., 2014). QS molekülleri biyofilm oluşumunda

önemli rol oynarlar. EPS ve virülans faktörlerinin üretimi QS sisteminin denetimi altındadır (Singh vd., 2017). Biyofilmler, QS sinyal molekülleri tarafından işlevsel olarak koordine edilir ve böylece patogeneze yol açan virülans faktörlerinin üretilmesine neden olurlar (Khan vd., 2019). *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri ve hareketlilik fenotiplerinin QS sistemi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Blus-Kadosh vd., 2013).

Biyofilm oluşumu; bakterilerin işbirliği içinde geliştirdiği ve bakteriler tarafından üretilen hücre dışı matris içinde gelişen mikroorganizmalardan oluşan bir süreçtir (Costerton vd., 1987). Bakterilerin bir yüzeye ilk tutunmasıyla biyofilm oluşum süreci başlar (Stepanovic vd., 2007). Bakterinin biyofilm oluşturma kapasitesi ve biyofilm oluşum aşamalarının gerçekleşmesi için gereken süre; tür, cins ve suşlara göre farklılık göstermektedir (Liu vd., 2015; Srey, Jahid ve Ha, 2013). Sıcaklık, oksijen değişkeni, antimikrobiyal madde varlığı, biyofilmin reolojik, yapışkan özellikleri ve ortamdaki pH biyofilm gelişimini etkileyen çevresel faktörlerdir (Garrett, Bhakoo ve Zhang, 2008). Ayrıca biyofilm oluşumu, mikroorganizma türü, besin ihtiyacı, inkübasyon süresi, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, yüzey materyali gibi faktörlere de bağlıdır (Douglas 2003; Donlan ve Costerton 2002). Liu vd. (2015)'in yaptıkları çalışmada *P. lundensis*'in 4 ila 6 saat içinde biyofilm oluşturmaya başladığını ve 4°C ve 10°C'de 30°C'ye göre daha fazla miktarda biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Steril et yüzeyinde *P. fragi* ve *P. lundensis* suşlarının 4°C'de ve 10°C'de 3, 5 ve 7 gün inkübe edildiği çalışmada oluşan biyofilmler konfokal lazer tarama mikroskobu ile görüntülenmiş ve biyofilm mikro yapıları arasında belirgin farklılıklar görülmüştür. *P. fragi* suşlarının yoğun, kalın ve homojen biyofilmler ürettiği, hücre arası boşlukların düzenli ve sıkı olduğu, *P. lundensis* suşlarının biyofilmlerinde hücre arası boşlukların düzensiz ve gevşek olduğu belirtilmiştir (Wickramasinghe vd., 2019).

Biyofilm oluşumu, bakterinin yüzeye tutunması, geri dönüşümsüz bağlanma, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu, kopma ve ayrılma olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir (Temel ve Eraç, 2018; Gupta vd., 2016; Watnick ve Kolter, 2000). Bu aşamalar Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Biyofilm Oluşum Aşamaları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

1-Tutunma

Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında, planktonik hücreler pilus ve flagella gibi uzantılar aracılığıyla yüzeylere tutunur (Garrett, Bhakoo ve Zhang, 2008; Marić ve Vraneš, 2007). Hücreler bu aşamada yüzeye yakındır ancak henüz yüzeye temas etmedikleri için durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler (Gün ve Ekinci, 2009; Lindsay ve Von Holy, 2006). Yüzey işlevselliği, yüzeyin fizikokimyasal özellikleri (yüzey dokusu), bakteri yönelimi, sıcaklık, basınç koşulları gibi faktörler, bakteri yapışmasına etki eder (Garrett, Bhakoo ve Zhang, 2008; Donlan, 2002).

2-Geri dönüşümsüz bağlanma

Bakteriler yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Otoindükleyici sinyallerin üretimiyle bakteri hücreleri arasında iletişim başlar ve hücreler EPS salgılayarak yüzeye sıkıca tutunurlar. Bu aşamada hücreleri yüzeyden uzaklaştırmak için fırçalama ve kazıma gibi güçlü fiziksel işlemler yapılmalıdır (Gün ve Ekinci, 2009).

3-Kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu

Kolonileşme evresinde bakteriler mikrokolonileri oluştururlar (Costerton vd., 1994). Bir biyofilmdeki bakteri kolonileri genelde substrat değişimi, metabolik ürünlerin

dağıtımı ve atılımı gibi birçok yönden birbiriyle koordine olan çeşitli mikro topluluklardan oluşmaktadır (Jamal vd., 2018).

4-Kopma ve ayrılma

Biyofilmin olgunlaşması sonrasında biyofilm yapısı içindeki planktonik hücreler, biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılırlar ve kolonizasyon için ortama dağılırlar (Jamal vd., 2018). Böylece yeni bir biyofilm oluşumu ilk aşamadan itibaren tekrar başlar. Biyofilm yapısı içindeki bakteriler, biyofilmi oluşturan polisakaritleri parçalayan enzimler üreterek biyofilmin kopmasını sağlarlar (Sutherland, 1999).

Biyofilm gelişimi, taze besiyeri ve besin var olduğu sürece devam etmektedir. Ortamdaki besin maddeleri tükendiği zaman yüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler taze besin kaynakları aramak için ortama yayılırlar (Gün ve Ekinci, 2009; Kolter, Siegele ve Tormo, 1993). Bakteri kolonileri tarafından üretilen ve biyofilm matrisinin parçalanmasında kullanılan enzimler, biyofilmi oluşturan polisakaritleri parçalar ve bakteriler yeni substratları kolonize etmek için serbest kalır. Bu enzimlere; *Escherichia coli* tarafından üretilen N-asetil-heparosan liyaz ve *Streptococcus equi* tarafından üretilen hiyalüronidaz örnek olarak verilebilir (Sutherland, 1999). Aljinat, *P. aeruginosa* biyofilmlerinde bulunan bir polisakarittir ve *P. fluorescens* ile *P. aeruginosa* tarafından üretilen aljinat liyaz ise bu polisakkariti parçalayan enzimlerden biridir (Gacesa, 1998).

Planktonik hücreler, gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan paslanmaz çelik, polistiren ve camdan yapılmış çeşitli abiyotik yüzeylere yapışabilir ve biyofilm oluşturabilirler (Kumari ve Sarkar, 2016). Biyofilm yapısı içindeki hücreler, biyofilmden ayrılarak yeni ortamlara göç edebilir ve ikincil kontaminasyona sebep olabilirler (Stoodley vd., 2002). Bu duruma ek olarak, biyofilm oluşturmamayan ancak öncü bakterilerin daha önceden oluşturduğu biyofilmlere yerleşen ve kolonize edebilen patojen veya gıda bozucu mikroorganizmalar da ikincil kontaminasyonlara neden olabilmektedir. Bu durumun önüne geçmek için ilk olarak *Pseudomonas* spp. gibi yüksek miktarda biyofilm oluşturma yeteneğine sahip öncü bakterilerin kontrolü gerekmektedir (Szczepanski ve Lipski, 2014; Sasahara ve Zottola, 1993). İkinci bir seçenek ise önceden oluşmuş ve olgunlaşmış biyofilmlerin temizlenmesidir ancak bu biyofilmlerin bertaraf edilmesi daha zahmetli olduğu için biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında, geri dönüşümsüz bağlanmanın gerçekleşmesine veya biyofilm

oluşumuna karşı önlemler alınması gerekmektedir. Bu amaçla bakteriyel tutunma gerçekleşmeden önce biyofilmlerin dezenfeksiyonu için gerekli dezenfektanların belirlenmesi ve bakteriyel tutunmayı önlemek amacıyla uygun yüzey materyalinin seçilmesi gibi önlemler uygulanmalıdır.

2.2.1 Gıda Endüstrisinde Biyofilm

Bozulma, gıda ürününün tüketilebilme özelliklerinin azalmasına ve değişmesine neden olan, ürünün duyu özelliklerinin tüketici için kabul edilemez olduğu değişikliklerdir. Gıda ürünüde bozulma; fiziksel değişiklikler, kimyasal değişiklikler (oksidasyon, renk değişikliği) veya mikrobiyal gelişim ile metabolizma sonucu açığa çıkan kötü tat ve koku değişiklikleri ile meydana gelir (Gram vd., 2002; Anonim, 1985). Gıdaların bozulması arzu edilmeyen bir durumdur. Geçmişten günümüze kadar insanlar, gıdaların bozulmasını önlemek ve gıdaları korumak amacıyla birçok farklı yöntem geliştirmiştir. Kullanılan tekniklerden bazıları; kurutma, tuzlama, ısıtma veya fermantasyon gibi temel işlemlerdir. Bu temel yöntemler günümüzde de hâlihazırda kullanılmaktadır (Anonim, 1985).

Günümüzde gıda endüstrisi için önemli problemlerden biri gıda bozulmalarıdır. Biyofilm oluşumu, gıdalarda kontaminasyona ve bozulmaya neden olmakla birlikte gıda ile temas eden üretim ekipmanlarının yüzeyinde oluştuğu zaman ekipmanlarda etkinlik ve verim kaybına, ısı transferinde, boru hatlarında verimliliğin azalmasına ve tıkanmalara neden olmaktadır (Sadekuzzaman vd., 2018). Bu durum gıda güvenliği ve tüketici sağlığı gibi önemli sorunları da beraberinde getirmektedir (Simões vd., 2008). Özellikle gıda endüstrisinde biyofilm oluşumu gibi bozucu faaliyetlerin engellenmesi için uygun yöntemlerin geliştirilmesine ve oluşmuş biyofilmlerin bertaraf edilmesi için yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Shi ve Zhu, 2009).

İstenmeyen bozulmaları, gıda bozucu bakterileri ve biyofilm oluşumunu önlemek için gıda endüstrisinde birçok farklı kimyasal koruyucu ve sentetik antimikrobiyal maddeler kullanılarak belirli aralıklarda temizlik ve sanitasyon uygulamaları yapılmaktadır. Temizlik işlemi, biyofilmle ilişkili EPS matrisini parçalayabilecek veya çözebilebilecek şekilde yapılmalıdır (Simões vd., 2006). Örneğin, amilaz, selüloz, liyaz, glikozidaz, proteaz ve DNaz gibi enzimler protein ve polisakkarit gibi organik makromoleküllerden oluşan biyofilmleri gidermek için gıda endüstrisinde

endüstriyel deterjanların bileşeni olarak kullanılırlar (Coughlan vd., 2016; Huang vd., 2014). EPS'nin yapısal bileşimi aynı tür bakteriler arasında bile değişiklik gösterebilir. Bu nedenle deterjanda kullanılan enzimlerin kombinasyonu önem taşımaktadır (Srey, Jahid ve Ha, 2013). Ayrıca biyofilmlerin uzaklaştırılması için fiziksel (ısı ve mekanik fırçalama, kazıma, yüksek basınçlı püskürtme), kimyasal (deterjan, dezenfektan ve koruyucu vb.) ve biyolojik (bakteriyosin, enzim vb.) yöntemler kullanılmaktadır (Steinberg vd., 2005; Kumar ve Anand, 1998).

Biyofilm oluşumunu önlemek için başlangıçta mikroorganizmanın yüzeye tutunmasını ve yapışmasını engellemek gerekmektedir (Song, Wu ve Xi, 2012). Bu nedenle özellikle gıda endüstrisinde, gıda ile temas eden yüzeylerde, ekipmanlarda ve gıda işleme alanlarında etkin hijyen ve sanitasyon uygulamalarının yapılması büyük önem taşımaktadır. Biyofilm oluşumunun engellenmesi kadar oluşan biyofilmin uzaklaştırılması da önemli bir konudur. Gıda endüstrisinde yüzey sterilizasyonunda kullanılabilen sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, klor bazlı ve fenolik dezenfektan gibi sıvı kimyasal dezenfektanlarla gerçekleştirilen dezenfeksiyon işlemi ile yüzeydeki biyofilmlerin bertaraf edilmesinde bu bileşikler yetersiz kalabilmektedir (Song, Wu ve Xi, 2012). Dezenfeksiyon ve sterilizasyon uygulamalarında kullanılan bu kimyasallar çevreyi olumsuz etkileyebilir ve gıda ile temas eden yüzeylerde kimyasal dezenfektanların arındırılma işlemi yeterli düzeyde yapılmazsa yüzeyde kalan kalıntılar insan sağlığı için de sakıncalı olabilir (Özkan ve Kırca, 2001). Ayrıca belirtmek gerekir ki sentetik koruyucular uzun vadede tüketicilerde sağlık sorunlarına yol açabilmektedir.

Günümüzde birçok tüketici, gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan doğal olmayan katkı maddelerine, kimyasal maddelere ve koruyuculara karşı dikkatli davranmakta, doğal içerikli veya katkı maddesi kullanılmayan ürünleri tercih etmektedir. Doğal bitki yağları, tüketicilerin bu isteğine uygun olarak gıdalardaki kimyasal koruyuculara karşı kullanılacak güvenli bir alternatiftir (Calo vd., 2015). Bu nedenlerle bakteri biyofilmlerinin antimikrobiyal maddelere ve ilaçlara karşı dirençli hale gelmesi ile antibiyotiklerin, dezenfektanların ve ağır metallerin yetersiz kalmasından dolayı doğal antimikrobiyal ve anti-biyofilm etkilere sahip olan esansiyel yağların gıda endüstrisinde kullanımını bir seçenek olarak görülebilir.

Biyofilmin ortamdaki uzaklaştırılmasında bazı dezenfektanların yetersiz kalmasının nedeni bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri sayesinde dezenfektanlara karşı

daha dirençli hale gelmesi veya mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirip, antimikrobiyal maddelerin etkinliğinin azalmasıdır (Artini vd., 2018). Bu nedenlerle özellikle antibiyotiklere dirençli suşlarla mücadele etmede alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmuş ve koruyucu olarak kullanılan sentetik kimyasallar yerine bitki ve baharat ekstraktları gibi doğal antibakteriyel ve antimikrobiyal bileşiklerin gıdaların korunmasında kullanımına olan ilgi zamanla artmıştır (Norajit, Laohakunjit ve Kerdchoechuen, 2007; Michel-Briand ve Baysse 2002). Antibiyotiklere alternatif yöntemlere örnek olarak literatürdeki bazı çalışmalar şu şekildedir (Michel-Briand ve Baysse 2002):

- 1- Virülans özellikleri inhibe edici maddeler (biyofilm oluşumu inhibitörleri dahil) (Silva vd., 2014)
- 2- Antimikrobiyal aşılar (Jansen vd., 2018)
- 3- Genetiği değiştirilmiş bakteriler (Herrera-Estrella ve Simpson, 1995)
- 4- Bakteriyofajlar ve bakteriyosinler (Klaenhammer ve Fitzgerald, 1994)
- 5- Bitki kaynaklı bileşikler ve uçucu yağlar (esansiyel yağlar) (Becerril ve Gómez-Lus, 2012)
- 6- Nanopartiküller (Tyagi vd.,2020)
- 7- Işık veya ultrasona dayalı diğer fiziksel mikroorganizma giderme yöntemleri (Dai vd., 2020)

Gıda endüstrisinde biyofilmlerin yüzeyden temizlenmesi, tamamen ortadan kaldırılması ve yüzeylerin dezenfekte edilmesi zor bir süreçtir. Bu sürecin ekonomik ve etkili yollarını bulmak da oldukça kritik bir konudur. Biyofilmleri bertaraf etmek veya azaltmak için çeşitli stratejiler uygulansa da bunların etkinlikleri sınırlı, maliyetleri yüksektir; ayrıca gıda güvenliği sorunları mevcuttur. Kullanılan kimyasal maddelere karşı bakterilerin direnç geliştirmesi de istenmeyen durumlardan biridir. Bu nedenlerle ultraviyole ışınlama, ultrason, doğal esansiyel yağlar, anti-biyofilm özellikleri olan probiyotikler ve QS inhibisyonu gibi güvenli ve çevre dostu stratejilerin geliştirilmesi değerlendirilmesi gereken oldukça önemli bir konudur (Vuotto, Longo ve Donelli, 2014; Srinivasan vd., 2008). Bakteriyosin, enzim ve esansiyel yağların antimikrobiyal ajan olarak kullanılması erişilebilirlik ve maliyet

açısından dezavantajlı bir konumda olsa da önümüzdeki yıllarda bu alandaki gelişmelerin artması ile bu sorunların çözülmesi öngörülmektedir.

2.2.2 Bakteriyel Hareketlilik

Bakteriyel hareketlilik, QS ve biyofilm oluşumuyla ilişkilidir (Myszka vd., 2016; Shroul vd., 2006). Yapılan çalışmalar bakterinin yüzey hareketliliğinin biyofilm yapısı üzerinde etkisinin olduğunu, aynı zamanda yüzey hareketliliğindeki farklılıkların biyofilm yapısında farklılıklara neden olduğunu göstermektedir (Shroul vd., 2006). Biyofilm oluşumunda temel düzenleyiciler; yüzme, kaynaşma ve seğirme hareketleri gibi virülans özellikleridir (Klausen vd., 2003). Bu üç hareket tipi, bakteriyel kolonizasyonda ve biyofilm oluşumunda elzemdir (O'May ve Tufenkji, 2011).

Flagella sayesinde hareket edebilen bakteriler yüzeylerde kemotaksise, bağlanmaya ve yapışmaya olanak bulmaktadırlar (Pratt ve Kolter, 1998). Flagellanın biyofilm oluşumuna katıldığı, biyofilm oluşumunda yüzme ve kaynaşma hareketlerinden sorumlu olduğu ve bununla birlikte çeşitli bakteriyel özelliklerin düzenlenmesiyle de ilişkili olduğu bilinmektedir (Parasuraman vd., 2020; Kirov, 2003). Flagella, bakterinin hareket etmesine ve yüzeye taşınmasına yardım ederken tip IV pilus ise seğirme hareketinde önemli rol oynamaktadır (Klausen vd., 2003).

Birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteride bulunan tip IV pilus, yüzeylere ve konakçı hücrelere yapışma, ökaryot hücrelere sinyal gönderme, protein salgılanması, DNA aktarımı ve mikrokoloni oluşumu gibi fonksiyonlara aracılık eden, yüzey hareketliliğinde özellikle seğirme hareketinde önemli rol oynayan güçlü ve esnek filamentlerdir (Melville ve Craig, 2013; Craig, Pique ve Tainer, 2004). Seğirme hareketi genelde Gram-negatif bakterilerde, flagelladan bağımsız olarak tip IV pilus aracılığıyla oluşmakta ve biyofilmlerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Mattick, 2002; O'Toole ve Kolter, 1998).

P. aeruginosa'nın yüzeyde hareket etmek için iki mekanizması vardır; seğirme ve kaynaşma (Shroul vd., 2006). *P. aeruginosa*, flagellanın aracılık ettiği yüzme hareketi sayesinde yüzeye yaklaşır, yüzeye bağlanma gerçekleştikten sonra flagella ve tip IV pilus aracılığı ile seğirme ve kaynaşma hareketleri ile yüzeye yayılır (O'May ve Tufenkji, 2011; Harshey, 2003).

P. fluorescens suşunun biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan yüzeye tutunmada, yüzeyle ilk temas eden bakteri parçasının flagella gibi uzantılar olduğu ayrıca flagellanın hücrelerin bir araya toplanmasında ve hücreler arası sinyalleşme ve bağlantıda rol oynayabileceği düşünülmektedir (Diaz vd., 2011).

O'Toole ve Kolter (1998) *P. aeruginosa* PA14 suşunu kullanarak yaptıkları çalışmada biyofilm oluşumu için ilk adım olan, hücrelerin abiyotik yüzeyle temas kurmasında flagella ve pilusun aracılık ettiği bakteriyel hareketliliğin önemli olduğunu ve seçirme hareketinde tip IV pilusun doğrudan rol oynadığını kanıtlamışlardır. Başka bir çalışmada *E. coli* suşu kullanılmış ve biyofilm oluşumunda yüzeyle ilk temas için kemotaksisin değil bakteriyel hareketliliğin kritik öneme sahip olduğu, hücrenin yüzeye bağlanmasında, yüzey boyunca hareket etmesinde ve biyofilm oluşumunun ilk aşamasında flagellanın ve bazı bakterilerde bulunan tip I pilusun gerekli olduğu bildirilmiştir (Pratt ve Kolter, 1998). Literatürde verilen bilgilere dayanarak, flagella ve pilusun aracılık ettiği bakteriyel hareketliliğin, biyofilm oluşumundaki öneminin doğrulanmış olduğu söylenebilmektedir.

2.3 Quorum Algılama Sistemi (Quorum Sensing, QS)

Quorum algılama (QS), popülasyon yoğunluğuna ve otoindükleyiciler (autoinducers, AI) olarak adlandırılan düşük yoğunluklu, hücre dışı sinyal moleküllerinin üretimine, salgılanmasına ve algılanmasına dayanan bir hücreler arası iletişim mekanizmasıdır (Kıymacı vd., 2018; Bassler ve Losick, 2006). Bakteriler arasındaki hücre-hücre iletişiminin keşfine kadar bakteriler, temel olarak besinleri bulmaya ve üremeye çalışan bireysel hücreler olarak biliniyorlardı (de Kievit ve Iglewski, 2000). Daha sonra yapılan çalışmalarda iş birliği ve etkileşim gibi sosyal davranışları gerçekleştirmek için bakterilerin hücreler arası iletişim kurabildikleri bulunmuştur (Abisado vd., 2018). Son yıllarda yapılan araştırmalar sayesinde, bakteri sosyalliği ve hücre-hücre etkileşim sistemi denilen QS sistemi anlaşılmaya başlanmıştır. İşbirlikçi ve rekabetçi mikrobiyal etkileşimlerde hem tür içindeki hem de türler arasındaki iletişimin sağlanmasında QS sisteminin rolü hala çözülmeye çalışılmaktadır (Abisado vd., 2018).

QS mekanizması, bakteri topluluğunun popülasyonda tek birim olarak koordine olmasını sağlamakla birlikte bakteri yoğunluğuna bağlıdır ve hücre

popülasyonlarının, hücre dışında biriken sinyal moleküllerine göre yoğunluklarını değerlendirmesini sağlar (Tan vd., 2020; Vadakkan vd., 2018). Bakteri popülasyonu arttıkça, hücre dışında sinyal molekülünün konsantrasyonu da artmaya başlar ve bu moleküller belli bir seviyeye yani eşik değere ulaştığında ise popülasyondaki bakteriler bu otoindükleyicileri algılar ve gen ekspresyonunu değiştirirler (Bassler ve Losick, 2006).

Sinyal molekülleri olan otoindükleyiciler QS mekanizmasında önemli rol oynarlar ve bakteri popülasyonu arttıkça hücre dışında birikirler (Vadakkan vd., 2018; Bassler ve Losick, 2006). Doğal ortamda, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin ürettiği sinyal molekülleri yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklıdır (Khan vd., 2019). Gram-negatif bakterilerde QS sistemi açıl homoserin laktonlar (AHL) aracılığı ile olurken, Gram-pozitif bakterilerde QS sistemi, kısa bir oligopeptit olan otoindükleyici peptit (AIP) aracılığı ile olmaktadır (Karaboz ve Sukatar, 2004). AHL QS sistemi ilk olarak deniz kökenli, Gram-negatif ve lüminesans bir bakteri olan *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır (Shadel ve Baldwin, 1992). Bu araştırmadan sonra yapılan çalışmalarla birlikte birçok farklı bakterinin QS sistemi anlaşılmaya başlanmıştır.

Otoindükleyici-2 (AI-2) birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri tarafından üretilen hem tür içi hem türler arası iletişimi sağlayan birincil sinyal molekülüdür (Wang vd., 2019; Duan vd., 2003). AI-2 QS sistemi ilk olarak Gram-negatif, lüminesans ve deniz bakterisi olan *V. harveyi*'de keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir (Bassler, Wright ve Silverman, 1994). *LuxS* geni tarafından kodlanan AI-2 molekülü, 4,5-dihidroksi-2,3 pentanedion (DPD) denilen bir öncül molekülden türetilmiştir (Bassler ve Losick, 2006). Birçok bakteri türü AI-2 üretiminde LuxS sentaz enzimini kullanmaktadır. AI-2, LuxP reseptörüne bağlanır ve böylece virülans faktörlerinin üretimi tetiklenir (Roy, Adams ve Bentley, 2011).

QS mekanizması, patojen bakteri enfeksiyonu oluşturma, biyofilm oluşumu, hareketlilik, antibiyotik üretimi, lüminesans ve virülans faktörlerinin salgılanması gibi çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynar (Bjarnsholt vd., 2005; Fuqua ve Greenberg, 2002; Whitehead vd., 2001). Ayrıca yapılan araştırmalarda QS'in bakteriyel gıda bozulmasında rol oynayabileceği ortaya konulmuştur (Smith vd., 2004).

Doğal ürünler, QS sistemini engelleyebilme potansiyeline sahip QS inhibitör bileşiklerinin kaynaklarıdır (Packiavathy vd., 2012). Deniz mikroalgi *Delisea pulchra* tarafından üretilen halojenli furanonlar karakterize edilen ilk QS inhibitör bileşiklerden biridir (Rasmussen vd., 2000; Givskov vd., 1996). Birçok bitkinin, sarımsak, zencefil, zerdeçal gibi baharatların ve tarçın, karanfil gibi esansiyel yağların QS sistemini inhibe etme potansiyeline sahip oldukları ve QS mekanizmasına müdahale ettikleri bilinmektedir (Vattem vd., 2007; Niu, Afre ve Gilbert, 2006; Egan vd., 2002). Anti-QS özelliğine sahip uçucu yağlar birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Kerekes vd., 2013; Jaramillo-Colorado vd., 2012). Aynı zamanda kekik esansiyel yağının anti-QS özelliğini kanıtlayan çalışmalar da literatürde mevcuttur (Alibi vd., 2020; Liu, Wang ve Griffiths, 2007; Hentzer ve Givskov, 2003).

QS sinyal sisteminin inhibisyonu, bitkilerdeki bazı bileşiklerin veya esansiyel yağların, sinyal moleküllerinin sentezini veya reseptörlere bağlanmasını bloke etmesi ya da AHL molekülünün eş reseptörüne bağlanarak AHL'lerin deaktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalar sayesinde gerçekleşebilmektedir (Myszka vd., 2016; Skandamis ve Nychas, 2012; Rasmussen vd., 2005). Yapılan bir çalışmada karvakrolün *P. aeruginosa*'nın hareketlilik ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği; ayrıca hücre canlılığını etkilemeden AHL sentezini azalttığı bildirilmiştir. Bu durum karvakrolün, LasI aktivitesini etkileyerek *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerini azaltması ile ilişkilendirilmiştir (Tapia-Rodriguez vd., 2019). Başka bir çalışmada ise farklı paketleme koşullarında (hava ve modifiye atmosfer) depolanan kıymada AHL ve AI-2 benzeri aktivitelerin gözlemlendiğini ancak kekik esansiyel yağı varlığında modifiye atmosferde depolanan etlerde hiçbir sinyal molekülün tespit edilemediği bildirilmiştir (Blana ve Nychas, 2014).

2.3.1 *Pseudomonas* Türlerinde Quorum Algılama Sistemi

Bakterilerde en detaylı araştırılan ve anlaşılan iletişim sistemlerinden biri *P. aeruginosa*'nın QS sistemidir. *P. aeruginosa* suşunun antibiyotik direncini, biyofilm oluşumu ve bakteriyel hareketlilik gibi virülans faktörlerini kontrol eden iki farklı QS sistemi; AHL vasıtasıyla çalışan Las ve Rhl'dir. QS sistemi genelde AHL sinyal molekülü ile düzenlenir ancak *P. aeruginosa* türüne özgü 2-heptil-3-hidroksi-4-

kinolon (*Pseudomonas* Quinolone Signal, PQS) sinyal molekülü de çeşitli virülans genlerinin kontrolünü gerçekleştirir (Ma vd., 2021; Kumar vd., 2015).

P. aeruginosa'nın *luxS* genine sahip olmadığı için AI-2 sinyal molekülünü üretmediği bildirilmiştir (Duan vd., 2003; Stover vd., 2000). Fakat *P. aeruginosa*'nın başka bakteriler tarafından üretilen AI-2 sinyalini algıladığı, tepki verdiği ve biyofilm oluşumu gibi virülans faktörü genlerini etkilediği ve aktive ettiği gözlenmiştir (Jiang vd., 2022; Li vd., 2015; Duan vd., 2003). *P. aeruginosa*'nın QS sistemi hakkında detaylı çalışmalar literatürde mevcut olsa da diğer *Pseudomonas* türleri ve *P. fragi*'nin QS sistemi ve mekanizması hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Birkaç *Pseudomonas* türü bakterinin QS sisteminin AHL ürettiği bilinmektedir. (Whitehead vd., 2001). Örneğin bazı *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarının QS sisteminde AHL sinyal molekülünü kullandığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Wang ve Xie, 2020; Li vd., 2018; Zhao vd., 2016; Liu, Wang ve Griffiths, 2007; Pinto vd., 2007).

Gıdalardan izole edilen bazı *Pseudomonas* izolatlarının ise QS sinyal molekülü olarak tespit edilebilir düzeyde AHL üretmediği bildirilmiştir ki bu durum bazı bakterilerde farklı bir iletişim mekanizmasının mevcut olabileceğini göstermektedir (Blana, 2010; Ferrocino vd., 2009; Liu, Gray ve Griffiths, 2006). Bu teoriyi destekleyecek şekilde Ferrocino vd. (2009)'in yaptığı çalışmada *P. fragi*'nin sinyal molekül olarak AI-2 ürettiği rapor edilmiştir. Başka çalışmalarda ise *P. fluorescens* süpernatantları, *V. harveyi* biyosensör suşunda biyoluminesans yayılımına neden olmuş ve AI-2 sinyal molekülleri tespit edilmiştir (Zhang vd., 2022; Wang ve Xie, 2020; Zhao vd., 2016). Buna ek olarak yapılan bir çalışmada *P. lundensis*'in AI-2 ürettiği bildirilmiştir (Zhu vd., 2022). Quintieri vd. (2021) *P. fragi*'nin genomunda AHL sentaz geninin bulunmadığını, Ferrocino vd. (2009) ise AHL üretmediği tespit edilen *Pseudomonas*'ların *LuxS* genine sahip olmadığını belirtmiştir. Bu bulgular bazı *Pseudomonas* türlerinin *LuxS*'ten farklı bir şekilde AI-2 üretim mekanizmasının olduğunu göstermektedir (Küçükata, Yetim ve Metin, 2024). Özellikle gıdalarda bozulmaya neden olan *Pseudomonas* türlerinde alternatif AI-2 üretim mekanizmaları ve yolları tam olarak aydınlatılmamış olduğu için bu konu hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.4 Esansiyel Yağlar

Esansiyel yağlar, destilasyon, soğuk presleme veya ekstraksiyon (maserasyon) gibi tekniklerle bitkilerden elde edilen aromatik yağlı sıvılardır (Burt, 2004; Guenther, 1950). Aromatik bir bitkinin ikincil metabolizmasının kokulu ve uçucu ürünleridir. Esansiyel yağlar bitkilerde buldukları ve elde edildikleri yaprak, çiçek, tohum veya meyve gibi bölgeye, çevresel faktöre, iklime, fenolojik döngüye ve yetiştirme biçimine göre farklı bileşim profillerine sahip olabilirler (Van vd., 2022; Conner, 1993).

Esansiyel yağlardaki aktif bileşikler kimyasal yapılarına göre; terpenler, terpenoidler, fenilpropenler ve diğerleri olmak üzere dört gruba ayrılabilir (Hyldgaard, Mygind ve Meyer, 2012). Fenolik bileşikler ve monoterenler bitkilerde doğal olarak bulunan ikincil metabolitlerdir ve bu bileşikler sayesinde esansiyel yağlar antibakteriyel ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir (Wińska vd., 2019; Tohidi vd., 2017; Conner, 1993). Esansiyel yağ bileşenlerinin kimyasal yapısı, yağın etki biçimini ve antibakteriyel aktivitesini etkilemektedir (Dorman ve Deans, 2000).

Karvakrol ve timol, kekik esansiyel yağının kemotipini tanımlayan fenolik bileşiklerdir (Rota vd., 2008). Timol ve karvakrol gibi fenolik monoterenlerin güçlü antibakteriyel özellikleri kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır. Bitki esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkisi, bu tür bileşiklerin lipofilik özelliği sayesinde bakterinin hücre zarına nüfuz etmesi ve böylece zarın yapısını ve fonksiyonunu bozarak hücre zarının geçirgenliğini etkileyip, hücre içi sıvının boşalmasına ve hücrenin ölmesine neden olarak sağlanır (Perez vd., 2019; Kang vd., 2018; Burt, 2004; Lambert vd., 2001).

Birçok bitkisel esansiyel yağın antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar ve antioksidan gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu literatürdeki pek çok araştırma ile kanıtlanmıştır (El-Tarabily vd., 2021; Alibi vd., 2020; Cui vd., 2019; Ali vd., 2015). Yapılan çalışmalarda bitki kaynaklı doğal bileşiklerin ve esansiyel yağların, güçlü anti-quorum algılama, anti-virülans ve anti-biyofilm etkisi gösterdiği bildirilmiş ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Ahmed vd., 2021; Pejčić vd., 2020; Myszka vd., 2016).

Kavanaugh ve Ribbeck (2012) yaptığı çalışmada esansiyel yağların, bakteri türüne özgü aktiviteye ve direnç mekanizmasına sahip olabileceğini ve bu farklılığın hücre

yapısı ve hücre bileşenlerinin yağa karşı farklı duyarlılıklarının olmasından kaynaklandığını varsaymışlardır.

Hussain vd. (2008) ve Artini vd. (2018) farklı mevsimlerde elde edilen belirli tür yağların, aynı bakteri türü üzerindeki değişen antimikrobiyal aktivitenin olası nedenini, mevsimle bağlantılı olarak artan veya azalan kimyasal bileşim ile ilişkilendirmişlerdir. Bitkinin hasat edilme mevsimine göre farklı kimyasal bileşimlere sahip yağların etkinliği de farklı olmaktadır (Pandur vd., 2022). Sonuç olarak test edilen esansiyel yağın kimyasal bileşimindeki farklılıklar, daha düşük veya daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye neden olmaktadır.

Pejčić vd. (2020) yaptıkları çalışmada adaçayı ve fesleğen yağlarının, *Pseudomonas* izolatlarının piyosiyenin üretimini ve yüzme, seğirme ve kaynaşma hareketlerini etkilediğini ayrıca biyofilm oluşumunun erken aşamalarında ve olgunlaşmış biyofilmde etkili olduğunu, biyofilm miktarında önemli ölçüde azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda adaçayı ve fesleğen esansiyel yağlarının, *Pseudomonas* türlerinin virülans faktörlerini azaltan etkili bir ajan olduğu söylenebilmektedir.

QS sistemi ve biyofilm oluşumu gibi bozucu faaliyetlerin engellenmesinde kullanılan doğal antimikrobiallardan biri olan esansiyel yağlarla ilgili detaylı çalışmalar devam etmektedir. Buna ek olarak doğadaki bitkilerde doğal olarak bulunan esansiyel yağlardan bazıları yıllardır antimikrobiyal olarak kullanılmakla birlikte birçok esansiyel yağ hâlâ araştırılmamıştır (El-Tarabily vd., 2021).

2.4.1 Kekik Yağı

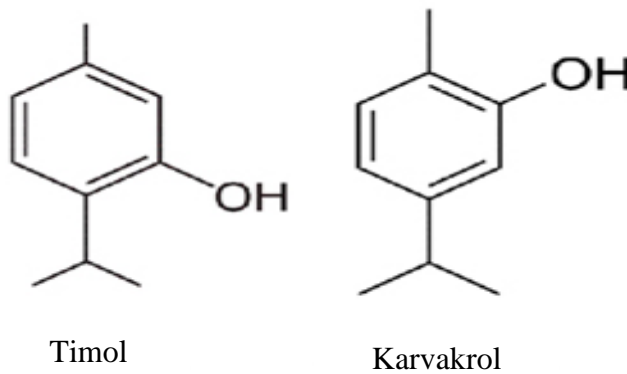
Thymus vulgaris, Lamiaceae familyasına ve *Thymus* cinsine ait en önemli türlerinden biridir (Morales, 2002). Kekik bitkisinin çiçeklerinden ve yapraklarından ekstrakte edilen ve yüzyıllardır kullanılan kekik esansiyel yağı, birkaç esansiyel yağ ile birlikte Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS (Genel olarak güvenli kabul edilen) olarak sınıflandırılmıştır (Manso vd., 2014).

Kekik esansiyel yağının ve ana bileşeninin, antioksidan, antibakteriyel, anti-virülans, anti-QS ve anti-biyofilm gibi biyoaktif özellikleri yapılan çalışmalarda bildirilmiş ve kanıtlanmıştır (Pandur vd., 2022; Van vd., 2022; Sotelo vd., 2021; Kerekes vd., 2019; Myszka vd., 2016; Szczepanski ve Lipski, 2014; Oussalah vd., 2006). Kekik

yağının antiviral, antibiyofil ve antibakteriyel özellikleri yağın biyolojik aktiviteye sahip olmasından kaynaklanır (Pandur vd., 2022). Bu özellikler ve biyolojik aktivite ise kekik yağının ana fenolik bileşikler olan timol ve karvakrol ile ilgilidir (Sá vd., 2014; Rota vd., 2008). Bakterinin hücre zarının parçalanması ve membran proteinleri ile hücre içindeki ATP ve DNA gibi hücre bileşenlerinin sitoplazma ile salınmasına neden olan fenolik bileşikler sayesinde kekik yağının antimikrobiyal etkisi gerçekleşmektedir (Alibi vd., 2020).

Kekik esansiyel yağı kullanılarak *Bacillus cereus*'un biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini belirleyen çalışmada, kekik yağının hücre canlılığını azalttığı, hücre zarına zarar vererek (zarın geçirgenliğini etkileyerek), hücre zarından protein sızıntısına, hücre içi ATP konsantrasyonunda azalmaya, hücre dışı ATP'de artmaya sebep olduğu bulunmuş ve kekik yağının biyofilmin oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca kekik yağına maruz kalan hücrelerin morfolojisinde değişiklikler olduğu, yüzeyinde çökme ve büzüşme meydana geldiği ve hücre zarında önemli hasara neden olarak hücre canlılığının önemli ölçüde engellendiği bildirilmiştir (Kang vd., 2018).

Terpenler, birkaç izopren (C₅H₈) birleşiminden üretilen hidrokarbonlardır. Timol ve karvakrol fenolik monoterpenoidlerdir. Çoğu terpenoidin antimikrobiyal etkisi fonksiyonel gruplarla bağlantılıdır. Kekik yağının ana bileşenleri olan ve yapısal olarak birbirine benzeyen timol ve karvakrol birbirinin izomeridir. Timolde fenolik halkada hidroksil grubu farklı bir konumdadır. (Hylgaard, Mygind ve Meyer, 2012). Şekil 2.3'de timol (C₁₀H₁₄O) ve karvakrolün (C₁₀H₁₄O) kimyasal yapıları verilmiştir.



Şekil 2.3: Timol ve Karvakrolün Kimyasal Yapısı

Kaynak: Hylgaard, Mygind ve Meyer, 2012

El-Hosseiny vd. (2014) yaptıkları çalışmada kekik, mercanköşkü ve adaçayı esansiyel yağlarının *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesini karşılaştırmış ve en aktif olanın kekik yağı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada on yedi uçucu yağın *Staphylococcus epidermidis* ve *E. coli* üzerindeki antibiyofilm aktivitesi incelenmiş ve *Thymus vulgaris* yağının en etkili ve en yüksek anti-biyofilm aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Cáceres vd., 2020).

Yapılan çalışmalarda kekik yağının *E. coli*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. *Aspergillus niger* ve *Penicillium paneum* gibi gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Kang vd., 2018; Sadekuzzaman vd., 2018; Boskovic vd., 2017; Ghabraie vd., 2016; Abdollahzadeh, Rezaei ve Hosseini, 2014). Diniz vd. (2023)'in yaptıkları çalışmada ise kekik esansiyel yağının, etten izole edilen *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus saprophyticus* türlerine karşı güçlü inhibitör aktiviteye sahip olduğunu ve alternatif bir doğal antibakteriyel ajan olduğunu bildirmişlerdir.

P. putida ve *P. aeruginosa*'nın ürettiği biyofilmleri ortadan kaldırmada kekik yağı ve önemli antibiyotiklerden hangisinin daha etkili olacağını karşılaştıran bir araştırmada, kekik yağının antibiyotiklerden daha etkili olduğu bildirilmiştir (Kavanaugh ve Ribbeck, 2012).

Zhang vd. (2018)'in yaptığı çalışmada, timol ve karvakrolün QS inhibisyon etkisine sahip olduğu; ayrıca *P. fluorescens*'in yüzme, seğirme ve kaynaşma hareketliliğini, EPS ve biyofilm üretimini önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir. EPS ve biyofilm inhibisyonu arasında doğrusal bir ilişki bulunamamış ve kekik yağı bileşenlerinin QS inhibitör etkisiyle EPS'yi inhibe ettiği, biyofilm inhibisyonunun ise bakteriyel hareketliliğe ve incelenmeyen diğer faktörlere bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. Benzer bir şekilde, kekik yağının *P. fluorescens*'in QS sistemini, AHL üretimini, biyofilm oluşumunu ve bakteriyel hareketliliğini önemli ölçüde inhibe ettiğini bildiren bir çalışmada flagella geninin (*flgA*) ifadesinin baskılanması ile hareketliliğin azaldığı ve biyofilm oluşumunun engellendiği bildirilmiştir (Myszka vd., 2016).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 *Pseudomonas* İzolatları ve Kontrol Suşları

Bu çalışmada 1220439 no'lu TUBİTAK projesi kapsamında kıyma ve biftekten izole edilen *Pseudomonas* suşları kullanılmıştır. *RpoD* gen dizilimleri izolatlardan YK8 ve YB91'in *P. fragi*, YK107'nin *P. bubulae*, YK50'nin *P. kulmbachensis* ve YB43'ün ise *P. fragi* yakını olası yeni tür olduğunu göstermiştir. Tez çalışmasında *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *P. fragi* ATCC 4973 referans *Pseudomonas* suşları, *Vibrio campbellii* BAA-1119 AI-2 üreticisi pozitif kontrol, *E. coli* DH5α AI-2 üretmeyen negatif kontrol ve *Vibrio campbellii* BAA-1117 ise AI-2 biyosensör suşu olarak kullanılmıştır. Kullanılan suşlar İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda yer almaktadır. Tez çalışmasında kullanılan *Pseudomonas* izolatlarının kodları, izole edildikleri kaynak ve bakteri türü Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan İzolatların Kodları ve Türleri

İzolat Kodları	Kaynak	Tür
YK 8	Kıyma	<i>P. fragi</i>
YK 50	Kıyma	<i>P. kulmbachensis</i>
YK 107	Kıyma	<i>P. bubulae</i>
YB 43	Biftek	<i>P. fragi</i> yakını olası yeni tür
YB 91	Biftek	<i>P. fragi</i>

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.1.2 Kekik Yağı (*Thymus vulgaris*)

Tez çalışmasında kullanılan kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağı FAİDA (Ankara, Türkiye) markasından satın alınmıştır. Uçucu yağlar ve bileşikleri hassas olduğundan dolayı, hava geçirmez cam şişede ve karanlıkta muhafaza edilen kekik yağının sterilizasyon işlemi, 0.22 µM gözenek büyüklüğüne sahip şırınga filtresinden (Chromafil Xtra) süzülerek yapılmıştır (Wang vd., 2008).

3.2 Metod

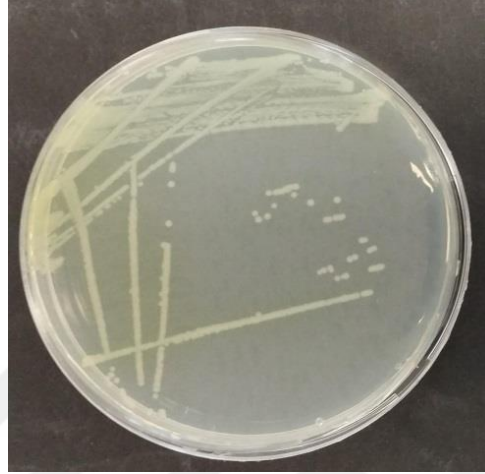
Yöntem, ilk olarak kekik esansiyel yağının uçucu bileşiklerinin tanımlanmasını ve kekik yağının *Pseudomonas* izolatları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesiyle 1/2, 1/4, 1/8 alt MİK değerleri kullanılarak AI-2 üretimi, biyofilm ve bakteriyel hareketlilik testlerinin yapılmasını içermektedir. Sıcaklığın ve sürenin etkisini daha fazla değerlendirmek için buzdolabı (4°C) ve oda sıcaklığı (25°C) seçilerek 1, 4, 7 günlük inkübasyon süreleri kullanılmıştır.

3.2.1 Stok ve Çalışma Kültürü Hazırlama

Tez çalışmasında kullanılan ve etten izole edilen *Pseudomonas* izolatları ile *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fragi* ATCC 4973 referans suşları, 1 mL steril Nutrient Broth (NB, Sigma-Aldrich, EK1) içeren kriyotüpte 25°C'de, *E. coli* DH5α suşu LB Broth (Neogen, EK1) içeren kriyotüpte 30°C'de, *Vibrio* suşları ise Marine Broth (MB, Himedia, EK1) içeren kriyotüpte 30°C'de 48 saat geliştirilmiştir. İnkübasyon sonrası otoklavda sterilize edilmiş, %50'lik gliserol çözeltisinden 500 µL kriyotüpe eklenerek vortekslenmiş ve stok kültürler -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışma sırasında stoktan alınan *Pseudomonas* suşları için katı besiyeri (agar) olarak Nutrient agar (NA, Sigma-Aldrich), *E. coli* DH5α suşu için LB agar (İnvitrogen), *Vibrio* suşları içinse Marine agar (MA, Himedia) kullanılmıştır. NA, MA ve LB agar protokollerinde belirtilen miktarda tartılmış ve üzerine distile su ilave edilerek çözündürülmüştür (EK1). Hazırlanan besiyerleri otoklavda (Selecta, Presoclave II, İngiltere) 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası yaklaşık 50°C'ye soğutulan agarlar, steril petrilere yaklaşık 15 mL olarak dökülmüştür. Stok kültürlerden alınan mikroorganizmalar, üç çizgi yöntemi kullanılarak NA'a, MA'a ve

LB agara ekilmiştir. *Pseudomonas* izolatları ve *P. fragi* ATCC 4973 25°C’de, *P. aeruginosa* ATCC 27853 37°C’de, *E. coli* DH5a suşu ve *Vibrio* suşları ise 30°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve agar yüzeyinde teke düşen koloni çalışmalarında kullanılmıştır. Şekil 3.1’de NA’da üç çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş *P. aeruginosa* ATCC 27853 tip suşunun petri görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Tip Suşunun Nutrient Agarda Koloni Görüntüsü

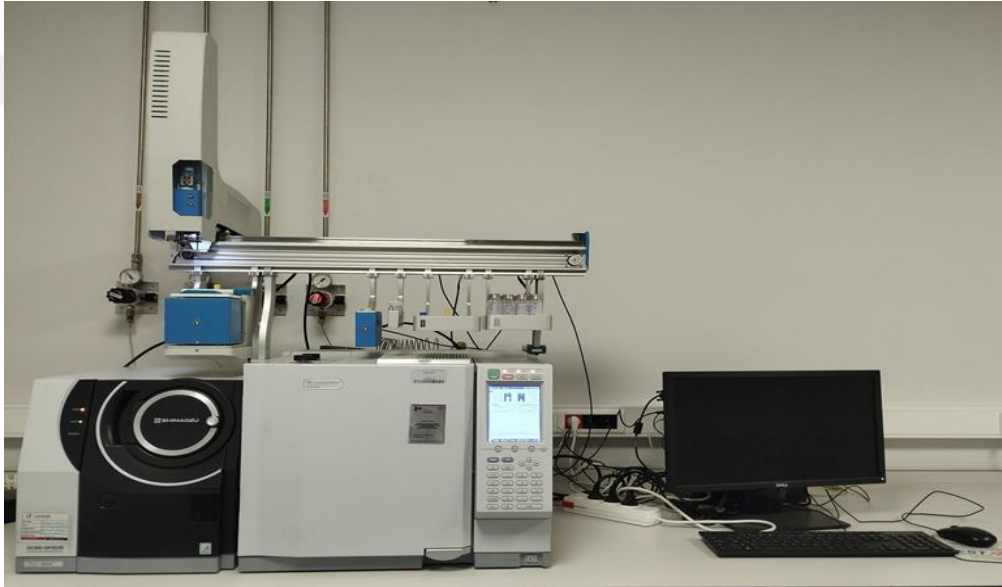
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.2 Kekik Esansiyel Yağının Uçucu Bileşenlerinin Belirlenmesi

Kekik esansiyel yağının uçucu bileşenlerinin tanımlanması ve miktar analizi için İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Sabri Ülker Araştırma ve Geliştirme Merkezi’nde bulunan Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) cihazı kullanılmış ve cihaz görseli Şekil 3.2’de verilmiştir.

Kekik esansiyel yağının headspace GC-MS analizi, GC2010 gaz kromatografisi, QP2020 kütle spektrometresi (SHIMADZU) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Arayüz ve kaynak sıcaklıkları sırasıyla 250°C ve 200°C olarak ayarlanmıştır. Elektron çarpma kütle spektrumları, 70 eV iyonizasyon enerjisinde, 40–500 amu aralığında kaydedilmiştir. Ayrıştırma, Rxi-5Sil MS (Restek Corporation, Bellefonte, PA, Amerika Birleşik Devletleri) (30 m×0.25 mm, d.f.=0.25 µm) füzyon silika bağlı faz kapiler kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık programı, 3 dakika boyunca

50°C'de izotermal olarak tutulmuş, ardından sıcaklık 3°C/dak hızla 260°C'ye ve 10°C/dak hızla 270°C'ye yükseltilmiştir; bu sıcaklık 1 dakika süreyle korunmuştur. Enjeksiyon sisteminin optimum parametreleri ise şu şekilde ayarlanmıştır: inkübasyon süresi 20 dakika, inkübasyon sıcaklığı 40°C, karıştırıcı hızı 100 rpm, pre-purge(ön temizleme) şırınga süresi 5 saniye, enjeksiyon akış hızı 1 mL/dak ve enjeksiyon sonrası bekleme süresi 20 saniyedir. Uçucu bileşikler, alıkonma zamanı ve kolon üzerindeki kütle spektrumlarının Wiley ve NIST (National Institute of Standards and Technology) kütüphanesinin kütle spektrumları ile karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır.



Şekil 3.2: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Cihaz Görself

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.3 Kekik Yağının *Pseudomonas* İzolatları Üzerindeki Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Kekik esansiyel yağının *Pseudomonas* izolatları üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) Hammer, Carson ve Riley (1999)'da anlatıldığı şekilde agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. MİK değerlerinin belirlenmesi için Mueller-Hilton agar (MHA, Neogen) hazırlanma yönergelerine (EK1) uygun olarak hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyona tabi tutulmuştur. Tween 80 (AFG Science) de otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Sterilizasyon sonunda MHA, yaklaşık 50°C'ye geldiği zaman önceden 0.22 µm filtre ile steril edilmiş %0,1-1 (v/v) kekik yağı ve %0,5 (v/v) steril Tween 80 ile kombinasyon halinde eklenerek katı agar (Mueller-Hilton agar) ortamında seyreltilmiştir. Belirli oranda steril kekik yağı ve Tween 80 içeren besiyerleri en az 15 saniye manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve aseptik ortamda steril petrilere dökülerek, oda sıcaklığında (20-25°C) katılaşıncaya kadar beklenmiştir.

Hazırlanan agarlar donduktan sonra 5 mL FTS (Fizyolojik tuzlu su, %0,85 NaCl) içine 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ kob/mL) bulanıklık standardına ayarlanan bakteri süspansiyonundan 2 µL kekik yağı içeren besiyerinin ortasına aşılansmış ve en az 30 dakika kurutulmuştur. *P. aeruginosa* tip suşu 37°C, *P. fragi* ve diğer izolatlar 25°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyinde görünür büyümenin engellendiği en düşük yağ konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir. 0.5 McFarland bulanıklık standardını ölçmek için densitometre (Biosan DEN-1, EU) cihazı kullanılmıştır.

Kullanılan konsantrasyonda Tween 80'in araştırılan suşların canlılığı üzerinde bir etkisi gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak, herhangi bir kekik yağı içermeyen ancak %0,5 (v/v) Tween 80 içeren aşılansmış besiyeri, negatif kontrol olarak yalnızca %0,5 (v/v) Tween 80 içeren aşılansmamış besiyeri kullanılmıştır.

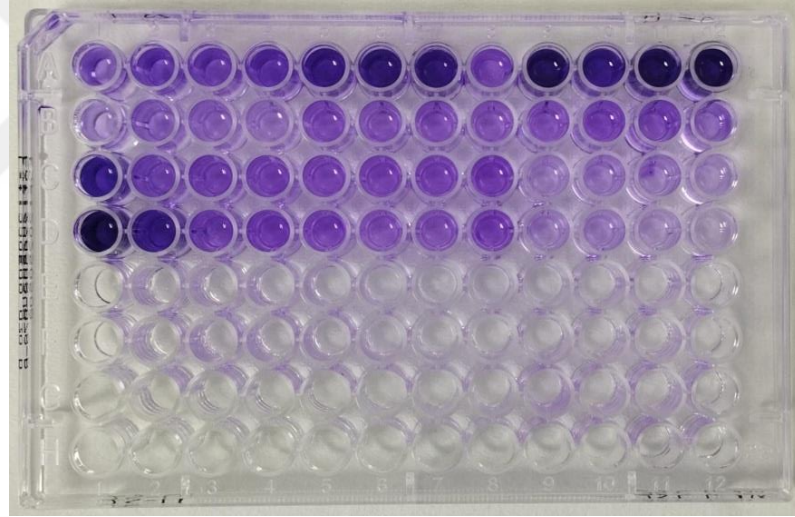
3.2.4 Biyofilm Oluşum Analizi

Kantitatif biyofilm analizi Stepanović vd. (2007) ve Liu vd. (2015)'in açıkladığı şekilde bazı değişiklikler yapılarak, 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakalarında kristal mor (CV) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. FTS ve TSB (Triptik soy broth, Sigma-Aldrich, EK1) 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

NA'da 24 saat geliştirilen izolatlardan birkaç koloni, 5 mL steril FTS içine süspansiyon edilmiş ve süspansiyon bulanıklığı densitometre kullanılarak 0,5 McFarlanda ayarlanıp, en az 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Mikroplak kuyucuklara, 1/2, 1/4, 1/8 MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağı ve %0,5 (v/v) Tween 80 içeren TSB'den 180 µL eklenmiştir. Daha sonra her kuyucağa 0,5 McFarland bulanıklık standardına ayarlanan bakteri süspansiyonundan 20 µL eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kuyucuklara sadece %0,5 (v/v) Tween 80 içeren 200 µL TSB eklenmiştir. Polistiren

mikrotitre plakaları, 25°C etüvde ve 4°C buzdolabı koşullarında 1, 4, 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda, kuyucuklardaki hücre yoğunluğu bir mikrolaka okuyucusu (INNO-M, LTEK, Güney Kore) kullanılarak OD₆₀₀ nm’de ölçülmüştür. Kuyucukların içindeki bakteriyel süspansiyon döküldükten sonra 3 kez taze TSB ile dikkatlice yıkanmıştır. 200 µL metanol (İsolab) ile 15 dakika süreyle sabitlenen hücreler 5 dakika boyunca 200 µL %1 (w/v) kristal viyole (EK1) ile muamele edilmiştir. Boyanan hücreler 3 kez distile su ile durulanıp, kurutulmuştur. Biyofilmlere bağlanan boya, 200 µL %33 (v/v) asetik asit (EK1) ile çözündürülmüştür. Ardından her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD), mikrolaka okuyucusu ile 590 nm’de ölçülmüştür. 96 kuyucuklu mikrolakada, biyofilmlere bağlanan boyanın asetik asit ile çözündürülmüş görseli Şekil 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.3: Biyofilmlere Bağlanan Boyanın Asetik Asit ile Çözündürülmesinden Sonra Mikrotitre Plakanın Görünümü

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.5 Hareketlilik Testleri

Bakteriyel hareketlilik testleri için seğirme (twitching), kaynaşma (swarming) ve yüzme (swimming) hareket testleri Kumar vd. (2015); Boles vd. (2005); Deziel vd. (2001)’de anlatıldığı şekilde bazı değişiklikler uygulanarak yapılmıştır. Kaynaşma hareket testi için % 0,5 agar (Liofilchem), 8 g/L nutrient broth, 5 g/L glukoz (Merck)

içeren yarı-katı agar, seğirme hareket testi için 20 g/l LB broth, %1 agar içeren yarı-katı agar, yüzme hareket testi için %1 Tryptone (Sigma-Aldrich), %0,5 NaCl (İsolab), %0,5 agar içeren yarı-katı agar hazırlanmıştır. Her hareket testi için özel olarak hazırlanan yarı-katı agarlar 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra, sıvı agara 1/2, 1/4, 1/8 MİK altı konsantrasyonlarında steril kekik yağı ve %0,5 (v/v) steril Tween 80 eklenerek en az 15 saniye manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve aseptik ortamda steril petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir.

Agarlar katılaştıktan sonra, NA'da 24 saat geliştirilen izolatlardan steril kürdan yardımıyla alınan koloni, yüzme, seğirme ve kaynaşma hareketi için hazırlanan agarların ortasına dikkatli bir şekilde ekilmiştir. Seğirme hareketi için steril kürdan ile alınan koloni, agarı delip petri kabın tabanına degecek ve polistiren yüzeyle temas edecek şekilde konulmuştur. Pozitif kontrol olarak, herhangi bir kekik yağı içermeyen ancak %0,5 (v/v) Tween 80 içeren yarı-katı agarlara ekim yapılmıştır. *P. aeruginosa* ATCC 27853 37°C, *P. fragi* ATCC 4973 ve diğer izolatlar 25°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından yüzme ve kaynaşma bölgelerinin çapları (mm) ölçülmüştür. Seğirme hareketi için, agar bir cımbız yardımıyla alınmış ve petri distile su ile yıkanmıştır. Böylece petriye yapışmayan hücreler giderilmiştir. Daha sonra petriler %1 (w/v) kristal viyole ile boyanmıştır. Boyanan bölgelerin zon bölgesi ölçülerek kaydedilmiştir.

3.2.6 AI-2 Üretimi

YK50, YK107 ve YB91 izolatların AI-2 üretimi, Surett ve Bassler (1998)'de anlatıldığı, Blana ve Nycas (2014) ve Ferrocino vd. (2009)'de uygulandığı şekilde, hücre süpernatantlarının AI-2 biyosensörü *V. campbellii* BAA-1117 suşunda sebep olduğu lüminesans vasıtasıyla belirlenmiştir.

Analizde kullanılan FTS ve LB Broth (Neogen, EK1) 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 4 mL LB besiyerine 1/2, 1/4, 1/8 MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağı ve %0,5 (v/v) Tween 80 eklenmiştir. Kekik yağı eklenmeyen kontrol örnekleri için LB besiyeri sadece %0,5 (v/v) Tween 80 içermektedir. Biyölüminesans belirteç suşu *V. campbellii* BAA-1117, AI-2 üreticisi ve pozitif kontrol suşu *V. campbellii* BAA-1119 MA'da, AI-2 üretmeyen negatif

kontrol *E. coli* DH5 α suşu LB agarda 30°C’de, *Pseudomonas* izolatları NA’da 25°C’de 24 saat geliştirilmiş ve inkübe edilen izolatlardan birkaç koloni, 5 mL steril FTS içine süspanse edilerek süspanسیون bulanıklığı 0,5 McFarlanda ayarlanmıştır. Belirli konsantrasyonlarda kekik yağı içeren ve içermeyen LB besiyerine, bakteri süspanسیونlarından 1 mL eklenmiş ve izolatlar LB besiyerinde, *V. campbellii* BAA-1119 referans suşu AB (autoinducer bioassay, EK-1) besiyerinde 25°C’de 6 saat, 125 rpm çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. 6 saatlik inkübasyondan sonra örneklerin planktonik hücre yoğunluğu bir mikropilaka okuyucusu kullanılarak OD₆₀₀ nm’de ölçülmüş ve örneklerin bulunduğu tüpler 4°C, 8000 g’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen hücresiz süpernatantlar 0,22 μ M gözenek büyüklüğüne sahip şırınga filtreden süzülmüş ve sonradan kullanılmak üzere -20°C’ de saklanmıştır.

AB besiyerinde 30°C’de 125 rpm çalkalamalı inkübatörde 16 saat gelişen biyosensör *V. campbellii* BAA-1117 suşu, taze AB besiyerinde 1:5000 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş *V. campbellii* BAA-1117 bakteri süspanسیونundan 90 μ L, hücre ekstraktlarından 10 μ L mikropilaka kuyucuklarına koyulmuştur. Pozitif kontrol olarak AI-2 üreten *V. campbellii* BAA-1119 suşu, örnek negatif kontrolü olarak AI-2 üretmeyen *E. coli* DH5 α suşu kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kuyucuklara 10 μ L steril LB besiyeri eklenmiştir. Mikropilakalar 30°C’de 125 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Biyoluminesans, negatif kontrol lüminesansta bir artış gösterene kadar her 30 dakikada bir mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Altıncı saatin sonundaki ölçüm analiz sonucu olarak kullanılmıştır.

3.2.7 İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında yapılan analizler 4 paralel ve 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Deney sonuçları, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey Testi yapılarak $p < 0,05$ önem seviyesinde değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler için kullanılan teknikler Minitab® 22 (State College, PA, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

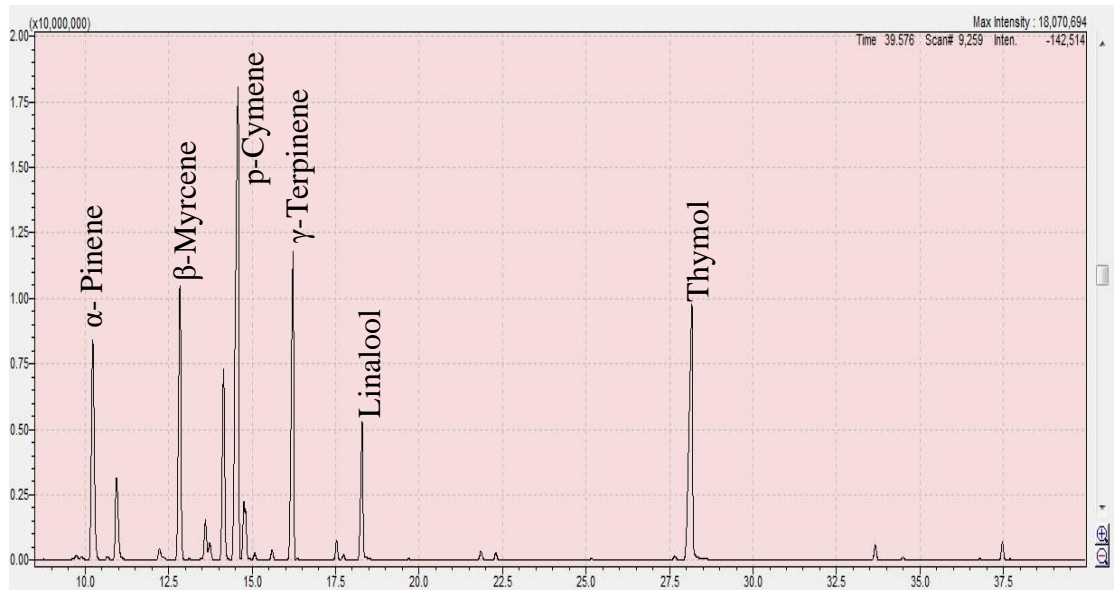
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu araştırmada kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağının uçucu bileşenleri belirlenmiş ve ardından kekik yağının etten izole edilmiş *Pseudomonas* suşları ile referans suşların biyofilm üretimi, bakteriyel hareketliliği ve AI-2 aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir. Kekik esansiyel yağının belirli *Pseudomonas* izolatları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiş daha sonra kekik yağının 1/2, 1/4 ve 1/8 alt MİK değerleri kullanılarak AI-2 üretimi ve bozucu faaliyetlere etkisi (biyofilm ve bakteriyel hareketlilik) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu bölümde alt başlıklar halinde sıralanmıştır.

4.1 Kekik Esansiyel Yağının Uçucu Bileşenleri

Kekik esansiyel yağında bulunan uçucu bileşenlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi GC-MS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kekik yağının GC-MS spektrumu Şekil 4.1’de, kekik yağına ait uçucu bileşenler ve yüzde oranları ise Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Thymus vulgaris* Esansiyel Yağının GC-MS Spektrumu

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.1: Kekik Esansiyel Yağına Ait Uçucu Bileşenler

No	Alıkonma Zamanı (Retention time, dk)	Bileşen Adı	Alan (%)
1	10.228	α - Pinene	14.09
2	10.942	Camphene	3.00
3	12.225	β -Pinene	0.39
4	12.845	β -Myrcene	15.15
5	13.604	α -Phellandrene	1.23
6	14.146	α -Terpinene	5.68
7	14.582	p-Cymene	33.29
8	14.754	D-Limonene	1.30
9	14.804	β -Phellandrene	1.01
10	15.079	cis-Ocimene	0.22
11	15.596	β -Ocimene	0.32
12	16.228	γ -Terpinene	16.77
13	17.529	α -Terpinolen	0.52
14	18.296	Linalool	4.45
15	19.729	Caren-3-ol	0.04
16	21.854	Borneol	0.29
17	22.300	Terpineol	0.25
18	25.163	Thymyl metil eter	0.06
19	27.650	Carvacrol	0.13
20	28.170	Thymol	20.69
21	33.663	β -Caryophyllene	0.42
22	37.467	β -Bisabolene	0.50
23	37.704	Germacrene	0.04

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Yapılan analizin sonucuna ve Tablo 4.1'e göre *T. vulgaris* esansiyel yağında bulunan temel uçucu bileşenlerin timol (%20.69), p-cymene (%33.29), β -myrcene (%15.15), γ -terpinene (%16.77), α -pinene (%14,09) olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, *T. vulgaris* esansiyel yağı kullanılarak yapılan daha önceki çalışmalarla benzer bulunmuştur. Perez vd. (2022)'in yaptıkları çalışmada timol (%24.87) ve p-cymene (%29.97) başlıca bileşenler olarak bulunmuştur. Diğer bir çalışmada ise timol (%23), p-cymene (%20), linalool (%4.7), γ -terpinene (%9.5) temel bileşenler olarak verilmiştir (Cáceres vd., 2020). Pirbalouti, Hashemi ve Ghahfarokhi (2013)'nin çalışmasında ise başlıca bileşenler timol (%35.51), linalool (%2.66), γ -terpinene (%11.87) olarak bulunmuştur. Yağın genel kimyasal kompozisyonundaki ve yüzde oranlarındaki farklılıkların gözlenmesinin nedeni bitkinin kökeni ve yetiştirilme koşulları, bitkinin hasat dönemi ve mevsimi, esansiyel yağın elde edilme yöntemi, ekolojik ve genetik faktörlerle ilişkilendirilebilir. Yapılan çalışmalar, bu faktörlerin kimyasal bileşim ve yüzde oranları üzerindeki etkisini kanıtlamıştır (Bakó vd., 2023; Wińska vd., 2019; Lemos vd., 2017; Pirbalouti, Hashemi ve Ghahfarokhi, 2013).

Kekik yağının temel bileşenlerinden biri olarak kabul edilen karvakrol, analiz sonuçlarına göre kullanılan esansiyel yağda düşük miktarda (%0,13) mevcuttur ve timol %20.69 olarak tespit edilmiştir. Literatürde de benzer şekilde, timol içeriği (%20-46), karvakrole kıyasla (%1-4) çok daha yüksek miktarda tespit edilmiştir (Wińska vd., 2019; Lemos vd., 2017; Ozcan ve Chalchat, 2004). Aynı zamanda analiz sonuçlarına göre ana bileşenlerden biri olan karvakrolün öncüsü p-cymene (%33.29) içeriği, timol (%20.69) içeriğinden daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. Bu duruma, literatürdeki benzer çalışmalar da işaret etmektedir; örneğin Perez vd. (2022)'in çalışmasında p-cymene (%29.97) içeriği, timol (%24.87) içeriğinden yüksek bulunmuştur. Karvakrolün öncü molekülü p-cymene ile timol ve karvakrolün biyosentezi için ilk molekül olan γ -terpinene'in antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bakó vd., 2023; Galasso vd., 2014).

Birçok çalışmada bildirildiği gibi p-cymene, β -myrcene, γ -terpinene, α -terpinene, α -pinene ve linalool *T. vulgaris* esansiyel yağında yüksek ve orta konsantrasyonlarda bulunabilen bileşikler oldukları için çalışmada elde edilen verilerin literatürdeki verilerle paralellik gösterdiği söylenebilmektedir (Bakó vd., 2023; Cáceres vd., 2020; Borugă vd., 2014; Ozcan ve Chalchat, 2004).

4.2 Kekik Yağının *Pseudomonas* İzolatları Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Agar dilüsyon metodu ile kekik esansiyel yağının *Pseudomonas* izolatları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir. %0,1-1 (v/v) kekik yağı ve %0,5 (v/v) Tween 80 içeren besiyerlerine ekim yapılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonunda agar yüzeyinde görünür büyümenin engellendiği en düşük yağ konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu %0,5 (v/v) Tween 80 içermektedir.

Tablo 4.2’de izolatların MİK değerleri % (v/v) cinsinden verilmiştir. En düşük MİK değeri %0,1 (v/v) ile YK50, en yüksek MİK değeri %0,5 (v/v) ile ATCC 28753 (*P. aeruginosa*) suşunda tespit edilmiştir. Genel olarak *Pseudomonas* izolatlarının *T. vulgaris* esansiyel yağına karşı *P. aeruginosa* ile karşılaştırıldığında daha düşük MİK (%0,1-%0,5 (v/v)) değerlerine sahip olduğu ortaya konmuştur.

Tablo 4.2: Kekik Yağının *Pseudomonas* Suşları Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerleri (%)

İzolat	MİK (v/v)
ATCC 27853 (<i>P. aeruginosa</i>)	%0,5
ATCC 4973 (<i>P. fragi</i>)	%0,2
YK 8	%0,2
YK 50	%0,1
YK 107	%0,2
YB 43	%0,2
YB 91	%0,3

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.3 Kekik Yağının *Pseudomonas* İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerine Etkisi

Biyofilm analizi, kekik yağının 1/2, 1/4 ve 1/8 alt MİK değerleri kullanılarak 96 kuyucuklu polistiren mikropalakalarda kristal mor (CV) yöntemi ile yapılmıştır. Negatif kontrol olarak kuyucuklara sadece %0,5 (v/v) Tween 80 içeren TSB eklenmiştir. Mikropalakaları, 25°C etüvde ve 4°C buzdolabı koşullarında 1, 4 ve 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından kuyucukların hücre yoğunluğu bir mikropalaka okuyucusu ile OD₆₀₀ nm'de, biyofilm miktarı ise OD₅₉₀ nm'de ölçülmüştür. Her suş için iki farklı sıcaklıkta ölçülen hücre yoğunluğu ve biyofilm miktarları grafiklerde (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8) verilmiştir. Belirlenen gün ve sıcaklık koşullarında biyofilm oluşum miktarları her bir suş için MİK altı konsantrasyonlara göre karşılaştırılmıştır.

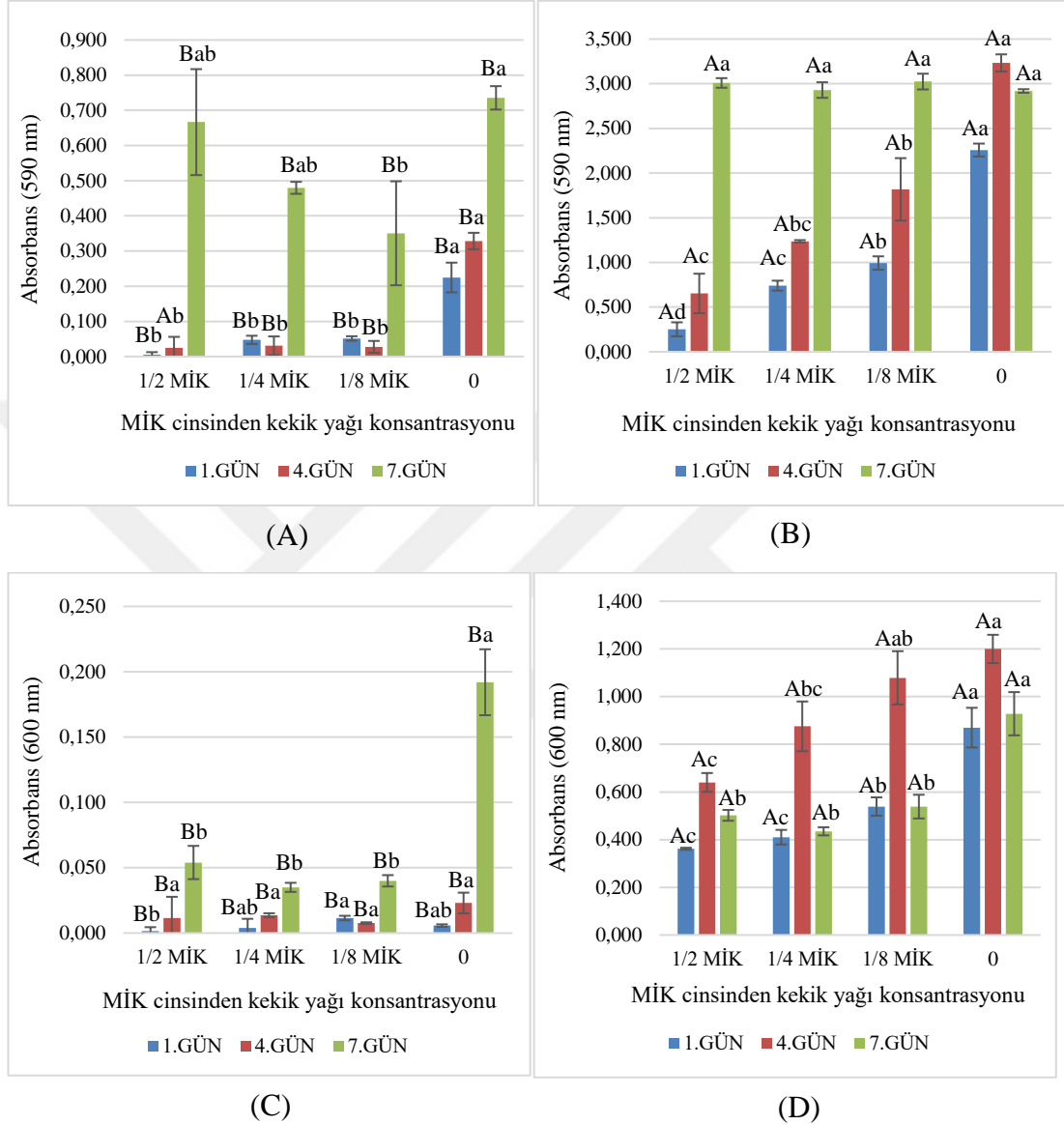
P. aeruginosa ATCC 27853 suşunun 4-25°C'de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.2'de verilmiştir.

Elde edilen verilere göre, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için 4°C'de biyofilm üretimi ve planktonik hücre gelişimi, 25°C'ye kıyasla çok daha düşük düzeydedir ($p < 0,05$). Bu suşun optimum gelişme sıcaklığının 37°C olması nedeniyle, 4°C'de gelişiminin sınırlı olduğu görülmektedir. Bu durum, 25°C'de biyofilm üretiminin 4°C'ye göre daha fazla olmasının ana nedeni olarak değerlendirilebilir.

Şekil 4.2 (A)'da 4°C'de tüm günlerde kekik yağı eklenmiş konsantrasyonların çoğunda kontrole (0) kıyasla biyofilm üretiminin önemli ölçüde engellendiği görülmektedir ($p < 0,05$). Şekil 4.2 (B)'de verilen sonuçlara göre 25°C sıcaklıkta her üç kekik yağı konsantrasyonunda 1. ve 4. günde biyofilm üretimini önemli ölçüde engellediği ($p < 0,05$) ancak 7. günde bu etkinin ortadan kalktığı ve tüm konsantrasyonlarda biyofilm üretiminin en yüksek düzeyde olduğu görülmektedir.

Planktonik hücre gelişimi *P. aeruginosa* ATCC 27853 için 4°C'de 4. günde alt-MİK konsantrasyonlarında kekik yağı eklenmiş örneklerle, kontrol (0) arasında anlamlı bir fark yokken ($p > 0,05$) 7. günde alt-MİK konsantrasyonlarında kekik yağı eklenen örneklerde kontrole (0) kıyasla hücre gelişiminde önemli düzeyde azalma olmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.2 (C)). Kekik yağlı örneklerde 25°C'de tüm günlerde kekik yağı içermeyen grupla karşılaştırıldığında alt-MİK konsantrasyonlarında hücre

gelişiminde önemli düzeyde ($p<0,05$) azalma olduğu söylenebilmektedir (Şekil 4.2 (D)).



Şekil 4.2: Kekik Yağının *P. aeruginosa* ATCC 27853^T Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

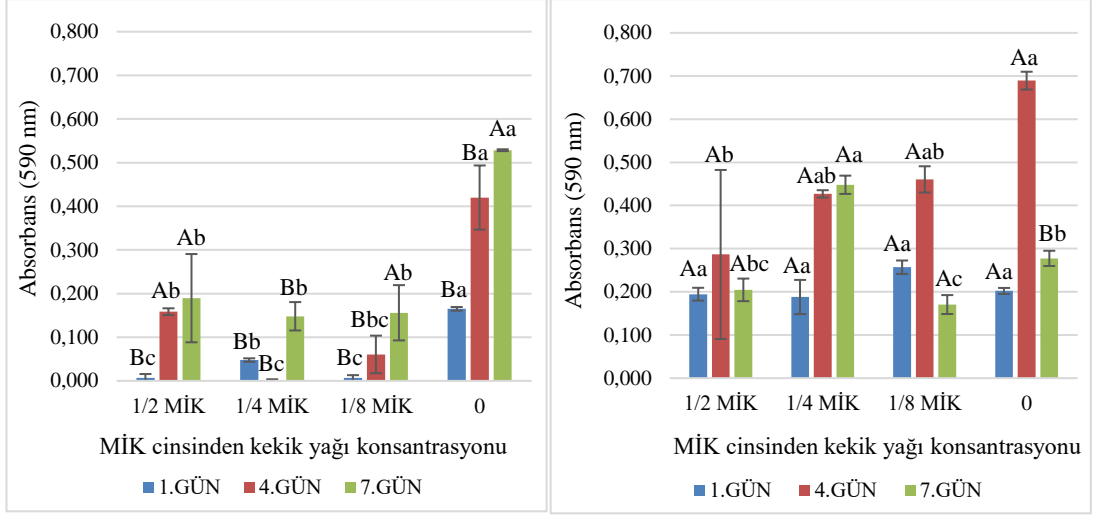
*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyonundaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir ($p<0,05$).

P. fragi ATCC 4973 suşunun 4-25°C'de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.3'te verilmiştir.

P. fragi ATCC 4973 suşunun kontrol örneğinde 1. ve 4. günde 25°C'de biyofilm üretimi 4°C'ye kıyasla daha yüksek düzeydeyken 7. günde 4°C'deki biyofilm üretiminin daha fazla olduğu söylenebilmektedir ($p<0,05$). Biyofilm üretimi 1/8 MİK konsantrasyonu değerinde de benzer şekildedir ancak 7. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). 1/4 alt-MİK konsantrasyonunda tüm günlerde 4°C'de biyofilm üretimi 25°C'ye kıyasla daha düşük düzeydedir ($p<0,05$). 1/2 alt-MİK konsantrasyonunda 1. günde biyofilm üretimide benzer şekildedir. Fakat 4. ve 7. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) bulunamamıştır (Şekil 4.3 (A), (B)).

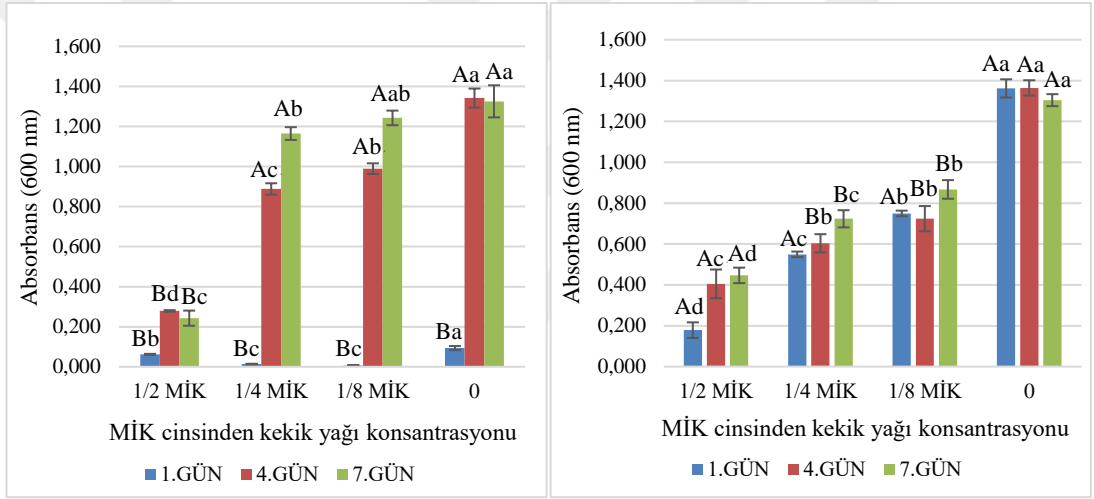
Şekil 4.3 (A)'ya göre 4°C'de tüm günlerde alt-MİK konsantrasyonu değerlerinde biyofilm üretimi, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneğine göre önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). Biyofilm üretimi 25°C'de 4. günde benzer şekildedeyken; 1. günde tüm alt-MİK konsantrasyonları ile kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneği arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). 25°C'de 7. günde kontrol örneğinden daha fazla biyofilm üretimi 1/4 MİK konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil 4.3 (B)).

Kekik yağı eklenmemiş kontrol örneğinde 1. günde 25°C'de hücre gelişimi 4°C'ye göre daha yüksek düzeydeyken ($p<0,05$) 4. ve 7. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). 1/4 ve 1/8 alt-MİK konsantrasyonlarında 1. günde 25°C'de hücre gelişimi 4°C'ye kıyasla daha yüksek düzeydeyken, 4. ve 7. günde 4°C'deki hücre gelişiminin daha fazla olduğu görülmektedir ($p<0,05$). 1/2 alt-MİK konsantrasyonu örneğinde ise tüm günlerde 25°C'de hücre gelişimi 4°C'ye göre daha yüksek düzeydedir ($p<0,05$). Planktonik hücre gelişiminin 4°C ve 25°C'de tüm günlerde kekik yağı eklenmiş tüm alt-MİK konsantrasyonlarında kontrole (0) kıyasla önemli düzeyde azaldığı söylenebilmektedir ($p<0,05$) (Şekil 4.3 (C), (D)).



(A)

(B)



(C)

(D)

Şekil 4.3: Kekik Yağının *P. fragi* ATCC 4973^T Suşunun 4°C (A) ve 25°C’de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C’de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyonundaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir ($p < 0,05$).

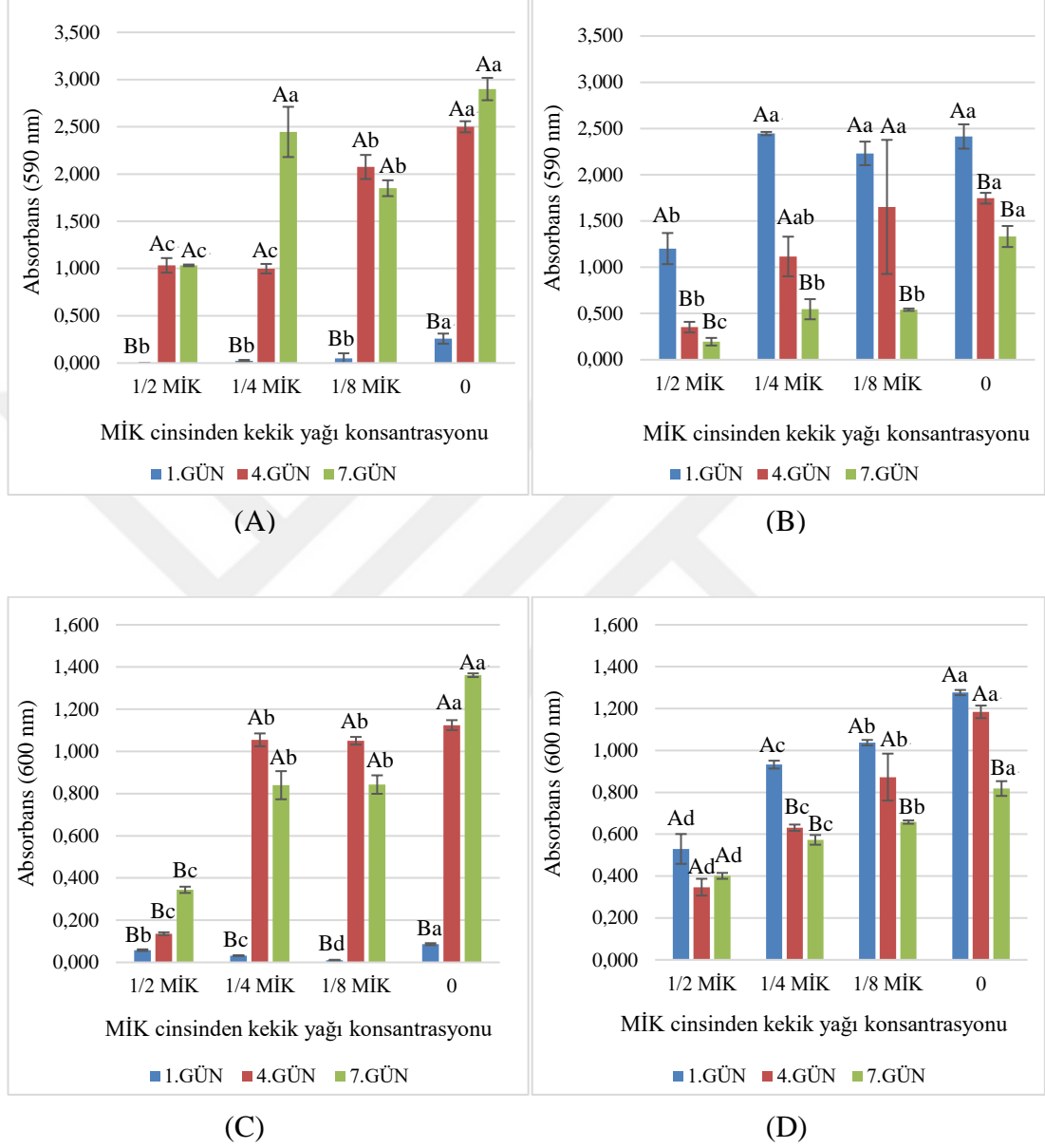
YK107 suşunun 4-25°C’de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.4’te verilmiştir.

Kekik yağı eklenmediği durumda, YK107 suşu 1. gün 25°C'de 4°C'ye göre daha fazla biyofilm üretirken 4. ve 7. günlerde 4°C'de daha fazla biyofilm üretmektedir. Kekik yağı eklenen örneklerde de benzer şekilde 1. gün 25°C'de 4°C'ye göre daha fazla biyofilm üretimi olmuş; 4. günde 4°C ve 25°C'de 1/4 ve 1/8 MİK konsantrasyonlarında istatistiksel olarak benzer biyofilm üretimi gözlenirken, 1/2 MİK konsantrasyonunda 4°C biyofilm üretimi 25°C'ye göre daha fazla olmuştur. 7. gün ölçümlerinde ise tüm örneklerde 4°C'de 25°C'ye göre daha fazla biyofilm üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.4 (A), (B)).

YK107 suşunun planktonik hücre yoğunluğu kekik yağı eklenmemiş kontrolde (0) 1. gün 4°C'de 25°C'ye göre daha düşükken, 4. gün hemen hemen aynı seviyede gözlenmiş, 7. gün ise 4°C'de 25°C'den daha yüksek hücre yoğunluğu elde edilmiştir (Şekil 4.4 (C), (D)). Şekil 4.4 (D)'e göre 25°C'de artan kekik yağı konsantrasyonları planktonik hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı azalmaya sebep olmuştur ($p<0,05$). Şekil 4.4 (C)'e göre 4°C'de de 4. ve 7. günde benzer şekilde bir azalma gözlenmiş, 1/4 ve 1/8 MİK konsantrasyonlarında kekik yağı, kekik yağı eklenmemiş örneğe nazaran hücre yoğunluğunun azalmasına sebep olmuş, en az hücre yoğunluğu ise 1/2 MİK konsantrasyonundaki örnekte gözlenmiştir. 4°C'de 1. günde, kekik yağı eklenmiş örneklerde hücre yoğunluğu kekik yağı eklenmemiş örneğe göre azalmış, fakat konsantrasyonla ilişkili bir azalma gözlenmemiştir. 4°C'de 1. gün örneklerinde çok az gelişme gözlenmiş olması sebebiyle de böyle bir sonuç elde edilmiş olabilir.

Özetle, kekik yağı eklenmemiş örneklerde 4°C'de hem hücre yoğunluğu hem de biyofilm üretimi 1. gün 25°C'ye göre daha azken, ilerleyen günlerde artmış ve 7. günde 4°C'de 25°C'ye oranla daha yüksek gelişme ve biyofilm üretimi gözlenmiştir. Ayrıca, hem 25°C hem de 4°C'de örneklere kekik yağı eklenmesi hücre yoğunluğunda genel olarak azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.4 (C), (D)). YK107 suşunun hücre yoğunluğu her iki sıcaklık değeri için de besiyerine eklenen kekik yağı oranı azaldıkça orantılı olarak artış göstermiştir (Şekil 4.4 (C), (D)). Kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alt-MİK değerlerinde biyofilm oluşum miktarı ve hücre yoğunluğu önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). Bu bulgular, kekik yağının biyofilm oluşumunu ve planktonik hücre büyümesini inhibe etme potansiyelini doğrulamakta olup, yüksek konsantrasyonların (1/2 MİK) biyofilm gelişimini daha etkili bir şekilde baskıladığına işaret etmektedir. Bununla

birlikte, kekik yağı konsantrasyonu azaldıkça (1/4 MİK ve 1/8 MİK) biyofilm oluşumunun zamanla arttığı ve inhibisyon etkisinin zayıfladığı görülmüştür.



Şekil 4.4: Kekik Yağının YK 107 Suşunun 4°C (A) ve 25°C’de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C’de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

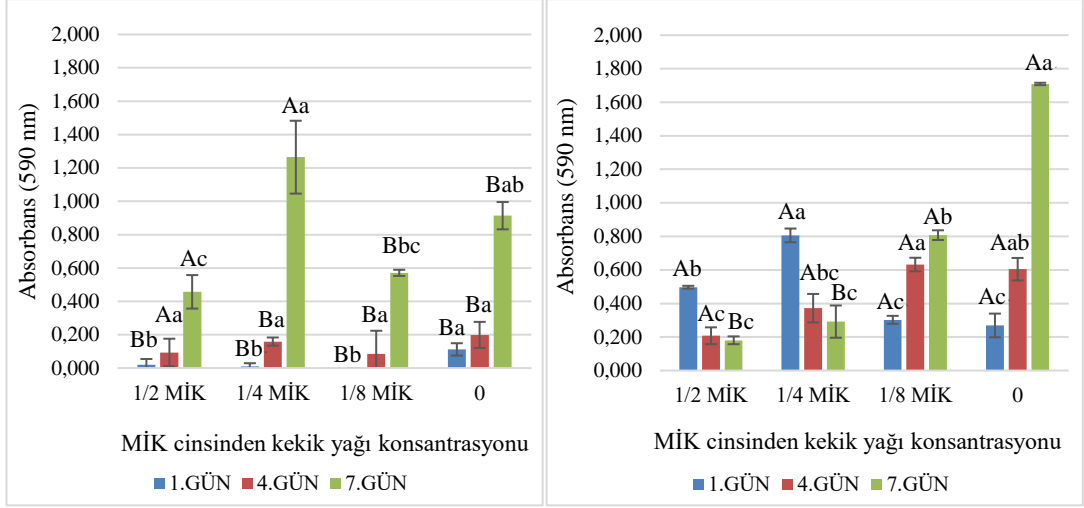
*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyonundaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir (p<0,05).

YK8 suşunun 4-25°C'de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.5'te verilmiştir.

Kekik yağı eklenmeyen (0) ve 1/8 MİK konsantrasyonunda kekik yağı eklenen örneklerde, tüm günlerde YK8 suşunun 25°C'de biyofilm üretimi 4°C'ye kıyasla daha yüksek düzeydedir ($p<0,05$). 1/4 MİK konsantrasyonu değerinde ise 1. ve 4. günde benzer şekildedir ancak 7. günde 4°C'de YK8 suşunun biyofilm üretiminin 25°C'ye göre daha yüksek olduğu söylenebilmektedir ($p<0,05$). 1/2 alt-MİK konsantrasyonundaki örnekte 1. günde biyofilm üretimi 4°C'de 25°C'ye kıyasla daha düşük düzeydedir ($p<0,05$) ancak 4. günde biyofilm üretiminde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) bulunamamışken 7. günde 4°C'de 25°C'ye göre daha yüksek biyofilm üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.5 (A), (B)).

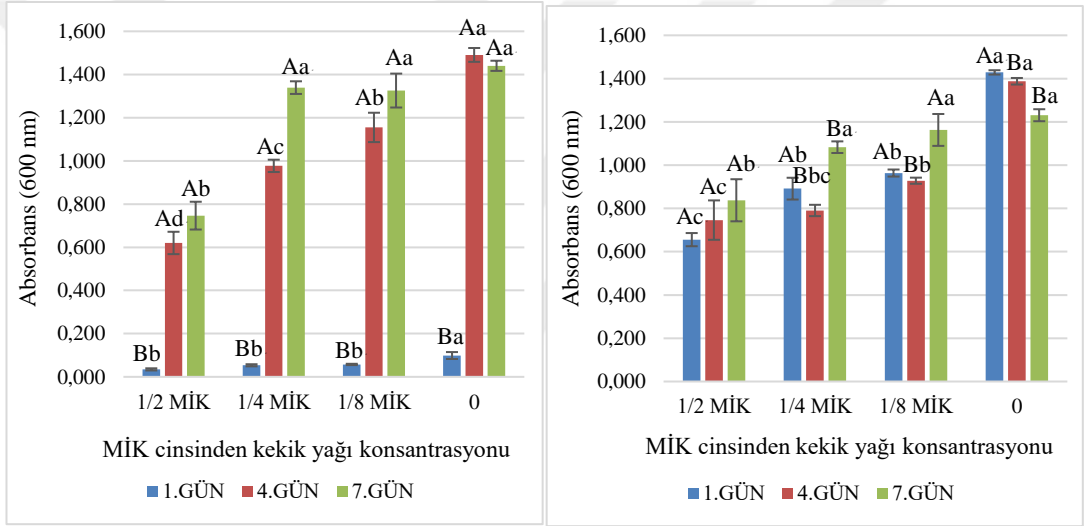
Şekil 4.5 (A)'ya göre 4°C'de 1. günde alt-MİK konsantrasyonu değerlerinde biyofilm üretimi, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneğine göre önemli ölçüde azalmışken ($p<0,05$) 4. günde hemen hemen aynı seviyede gözlenmiştir. 7. gün ise kontrol örneğinden daha fazla biyofilm üretimi 1/4 MİK konsantrasyonunda gözlenmiştir. Şekil 4.5 (B)'ye göre 25°C'de 1. günde biyofilm üretiminin benzer şekilde olduğu söylenebilmektedir. 4. ve 7. günde ise tüm alt-MİK konsantrasyonu değerlerinde biyofilm üretimi, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneğine göre önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$).

YK8 suşunun planktonik hücre gelişimi, kekik yağı eklenmemiş kontrolde (0), 1/8 ve 1/4 MİK konsantrasyonunda kekik yağı eklenen örnekte 1. gün 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksekken, 4. gün 4°C'de 25°C'den daha yüksektir ($p<0,05$). Kontrolde (0) ve 1/4 MİK konsantrasyonunda kekik yağı eklenen örnekte hücre gelişimi 7. günde 4°C'de 25°C'den daha yüksekken, 1/8 alt-MİK konsantrasyonu değerinde ise hemen hemen aynı seviyede gözlenmiştir. Benzer şekilde 1/2 MİK konsantrasyonu değerinde 4. ve 7. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) ancak 1. günde 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksek hücre yoğunluğu elde edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.5 (C), (D)). Her iki sıcaklık değerinde de kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneği ile karşılaştırıldığında tüm alt-MİK değerlerinde hücre yoğunluğu genel olarak önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$).



(A)

(B)



(C)

(D)

Şekil 4.5: Kekik Yağının YK 8 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyondaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir ($p < 0,05$).

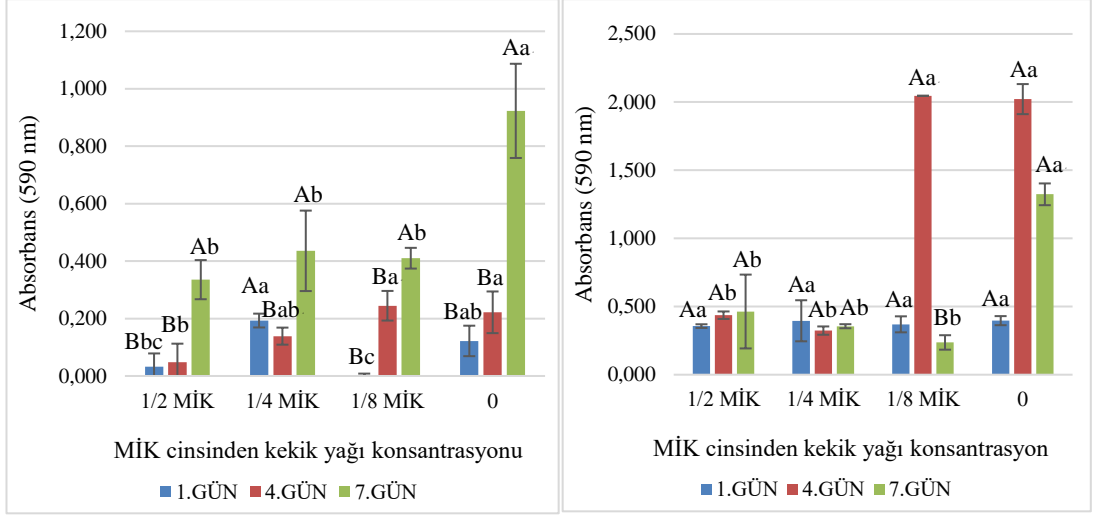
YB43 suşunun 4-25°C'de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.6'da verilmiştir.

Kekik yağı eklenmeyen (0) ve 1/2 konsantrasyonunda kekik yağı eklenen örneklerde, 1. ve 4. günde YB43 suşunun 25°C'de biyofilm üretimi 4°C'ye kıyasla daha yüksekken ($p<0,05$), 7. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). 1/4 MİK konsantrasyonu değerinde ise 1. ve 7. günde 4°C ve 25°C'de istatistiksel olarak benzer biyofilm üretimi gözlenirken, 4. günde 25°C'de YB43 suşunun biyofilm üretiminin 4°C'ye göre daha yüksek olduğu söylenebilmektedir ($p<0,05$). 1/8 alt-MİK konsantrasyonundaki örnekte 1. ve 4. günde biyofilm üretimi 4°C'de 25°C'ye kıyasla daha düşük düzeydedir ($p<0,05$) ancak 7. günde 4°C'de 25°C'ye göre daha yüksek biyofilm üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.6 (A), (B)).

Her iki sıcaklık değerinde de YB43 suşunun alt-MİK konsantrasyonlarında biyofilm üretimi, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneğine göre genel olarak önemli ölçüde azalmışken ($p<0,05$), Şekil 4.6 (B)'ye göre 25°C'de 1. günde istatistiksel olarak benzer biyofilm üretimi gözlenmiştir ($p>0,05$). Şekil 4.6 (A)'ya göre ise 4°C'de 1. günde kontrol örneğinden daha fazla biyofilm üretimi 1/4 MİK konsantrasyonunda gözlenmiştir.

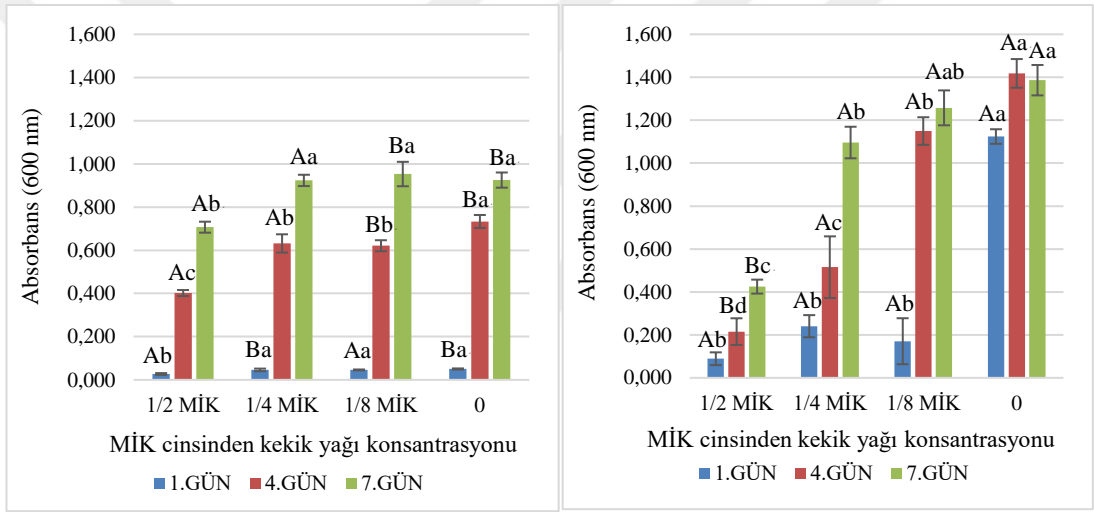
YB43 suşunun planktonik hücre gelişimi, kekik yağı eklenmemiş kontrolde (0) tüm günlerde 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksektir ($p<0,05$). 1/8 MİK konsantrasyonunda kekik yağı eklenen örnekte hücre gelişimi 4. ve 7. günde 25°C'de 4°C'den daha yüksekken ($p<0,05$), 1. günde ise hemen hemen aynı seviyede gözlenmiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde 1/4 MİK konsantrasyonu değerinde 4. ve 7. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) ancak 1. günde 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksek hücre yoğunluğu elde edilmiştir ($p<0,05$). 1/2 MİK konsantrasyonunda kekik yağı eklenen örnekte hücre gelişimi 4. ve 7. günde 4°C'de 25°C'den daha yüksekken ($p<0,05$), 1. günde ise hemen hemen aynı seviyede gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.6 (C), (D)).

Her iki sıcaklık değerinde de kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneği ile karşılaştırıldığında tüm alt-MİK değerlerinde hücre yoğunluğu önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$).



(A)

(B)



(C)

(D)

Şekil 4.6: Kekik Yağının YB 43 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyondaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişiyi göstermektedir ($p < 0,05$).

YK50 suşunun 4-25°C'de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.7'de verilmiştir.

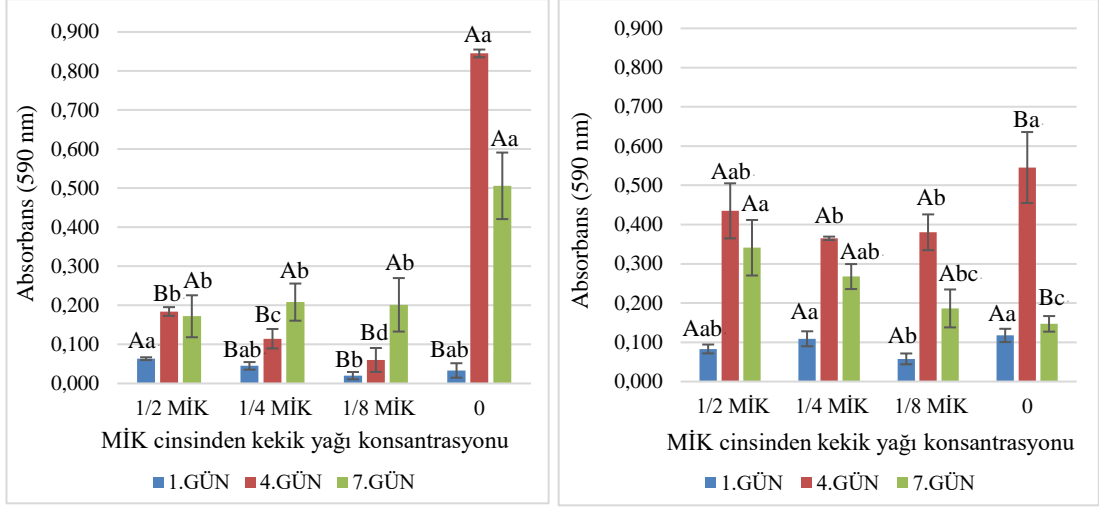
Kekik yağı eklenmediği (0) durumda, YK50 suşu 1. gün 25°C'de 4°C'ye göre daha fazla biyofilm üretirken, 4. ve 7. günlerde 4°C'de daha fazla biyofilm üretmektedir ($p<0,05$). 1/4 ve 1/8 MİK konsantrasyonu değerinde ise 1. ve 4. günde 25°C'de YK50 suşunun biyofilm üretiminin 4°C'ye göre daha yüksek olduğu söylenebilmektedir ($p<0,05$). Ancak 7. günde 4°C ve 25°C'de istatistiksel olarak benzer biyofilm üretimi gözlenmiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde 1/2 alt-MİK konsantrasyonundaki örnekte 1. ve 7. günde biyofilm üretimi 4°C'de 25°C'de hemen hemen aynı seviyededir ($p>0,05$). 4. günde ise 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksek biyofilm üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.7 (A), (B)).

Her iki sıcaklık değerinde de YK50 suşunun alt-MİK konsantrasyonlarında biyofilm üretimi, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneğine göre genel olarak önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). Şekil 4.7 (A)'ya göre 4°C'de 1. günde kontrol örneğinden daha fazla biyofilm üretimi 1/2 MİK konsantrasyonunda gözlenmiştir. Şekil 4.7 (B)'ye göre 25°C'de 7. günde alt-MİK konsantrasyonlarında biyofilm üretiminin aynı gündeki kontrol grubuna (0) göre daha fazla olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

YK50 suşunun planktonik hücre gelişimi, kekik yağı eklenmemiş kontrolde (0) tüm günlerde 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksektir ($p<0,05$). Kekik yağı eklenen örneklerde de benzer şekilde 1. ve 4. günlerde 25°C'de daha fazla hücre yoğunluğu ($p<0,05$) elde edilmişken 7. günde 1/4 ve 1/8 MİK konsantrasyonlarında istatistiksel olarak benzer hücre gelişimi gözlenmiştir ($p>0,05$). 7. günde 1/2 MİK konsantrasyonunda hücre gelişimi ise 4°C'de 25°C'ye göre daha fazladır ($p<0,05$) (Şekil 4.6 (C), (D)).

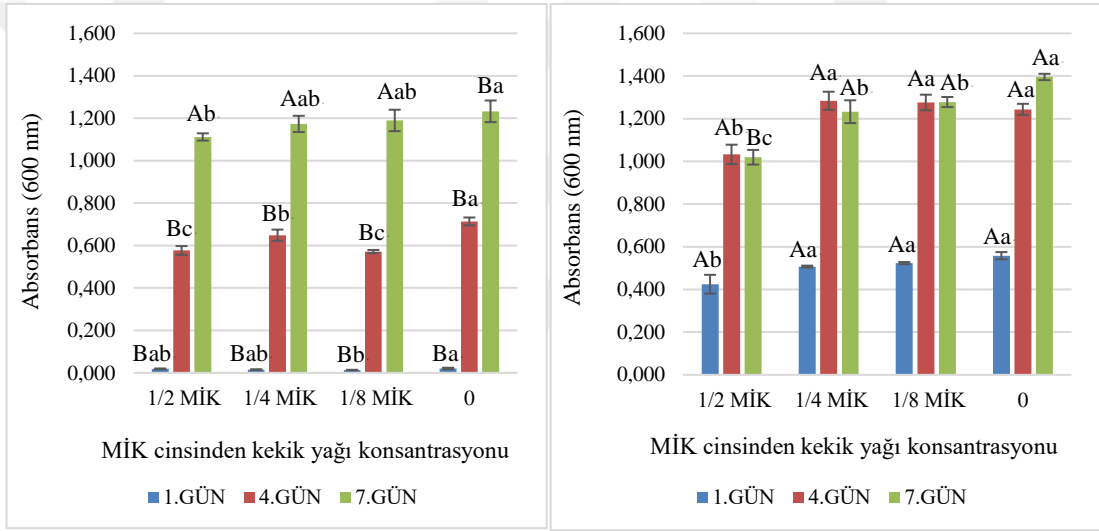
İki farklı sıcaklık değerinde de kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneği ile karşılaştırıldığında tüm alt-MİK değerlerinde planktonik hücre gelişiminde önemli düzeyde azalma olduğu söylenebilmektedir ($p<0,05$).

YB91 suşunun 4-25°C'de biyofilm ve hücre yoğunluğu üzerindeki kekik yağı konsantrasyonlarının (MİK cinsinden) inhibe edici etkisini gösteren grafikler Şekil 4.8'de verilmiştir.



(A)

(B)



(C)

(D)

Şekil 4.7: Kekik Yağının YK 50 Suşunun 4°C (A) ve 25°C'de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C'de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyondaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir ($p < 0,05$).

Kekik yağı eklenmeyen (0) kontrolde 1. ve 7. günde YB91 suşunun 25°C'de biyofilm üretimi 4°C'ye kıyasla daha yüksekken ($p < 0,05$), 4. günde iki sıcaklık değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$). Benzer şekilde 1/8 MİK

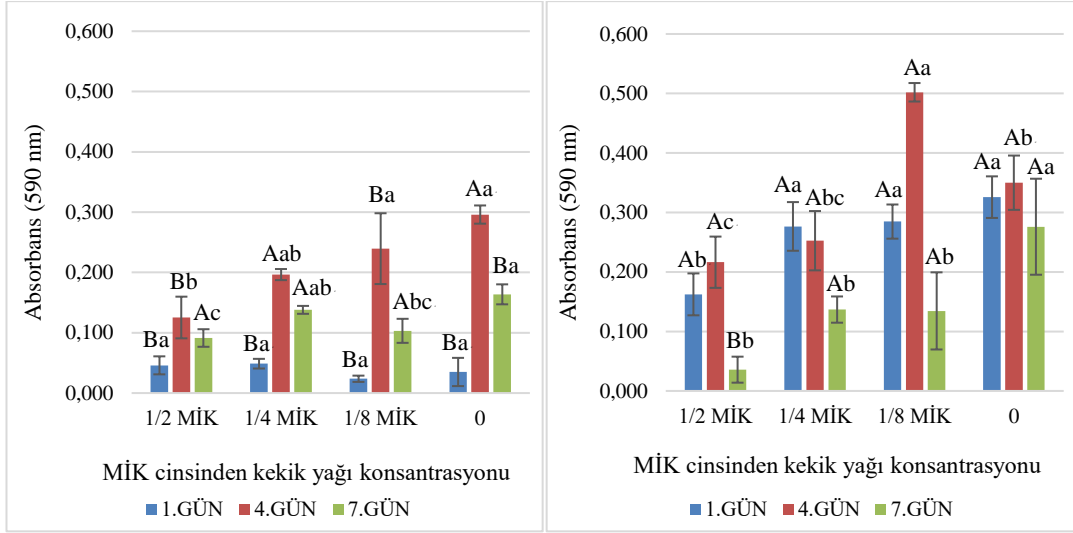
konsantrasyonu değerinde de 7. günde 4°C ve 25°C'de istatistiksel olarak benzer ($p>0,05$) biyofilm üretimi gözlenirken, 1. ve 4. günde 25°C'de YB91 suşunun biyofilm üretiminin 4°C'ye göre daha yüksek olduğu söylenebilmektedir ($p<0,05$). 1/4 alt-MİK konsantrasyonundaki örnekte 1. günde biyofilm üretimi 4°C'de 25°C'ye kıyasla daha düşük düzeydedir ($p<0,05$) ancak 4. ve 7. günlerde hemen hemen aynı seviyededir ($p>0,05$). 1/2 alt-MİK konsantrasyonundaki örnekte ise 1. ve 4. günlerde biyofilm üretimi 25°C'de 4°C'ye göre daha yüksekken, 7. günde 4°C'de 25°C'ye göre daha yüksek biyofilm üretimi gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.8 (A), (B)).

Her iki sıcaklık değerinde de YB91 suşunun alt-MİK konsantrasyonlarında biyofilm üretimi, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneğine göre genel olarak önemli ölçüde azalmışken ($p<0,05$), Şekil 4.8 (A)'ya göre 4°C'de 1. günde istatistiksel olarak benzer biyofilm üretimi gözlenmiştir ($p>0,05$). Şekil 4.8 (B)'ye göre ise 25°C'de 4. günde kontrol örneğinden daha fazla biyofilm üretimi 1/8 MİK konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Kekik yağı eklenmeyen (0) ve eklenen örneklerde, tüm günlerde YB91 suşunun 25°C'de hücre gelişimi 4°C'ye kıyasla daha yüksek düzeydedir ($p<0,05$). Her iki sıcaklık değerinde de kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol örneği ile karşılaştırıldığında tüm alt-MİK konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.8 (C), (D)).

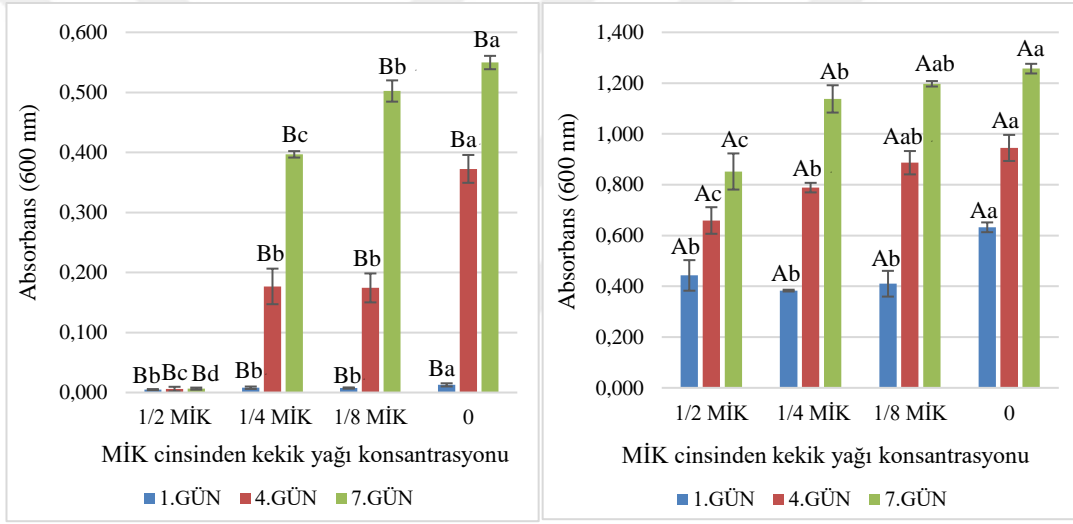
Yapılan analizler sonucunda kekik yağını besiyeri ortamıyla karıştırmak için %0,5 (v/v) Tween 80 ilave edilmiş ve bu konsantrasyonda Tween 80'in planktonik hücrelerin gelişimini veya canlılığını engellemediği suşların hücre yoğunlukları grafiklerine bakarak söylenebilmektedir. Elde edilen bilgilere dayanarak, MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağının, izolatların planktonik hücre gelişimini kontrol grubuna (0) kıyasla önemli ölçüde azalttığı ($p<0,05$) belirlenmiştir. Aynı zamanda izolatların çoğunda kekik yağı konsantrasyonuna bağlı olarak planktonik hücre gelişiminde azalma görülmüştür.

Biyofilmin yoğunluğu, inkübasyon süresine bağlı olduğundan dolayı inkübasyon süresi oldukça önemli bir parametredir (Stepanović vd., 2007). Ton balığından izole edilen *P. fluorescens*'in biyofilm oluşumu ile ilgili yapılan bir çalışmada, 4 günlük inkübasyon süresince biyofilm üretiminin arttığı, 5. günden sonra azalmaya başladığı bildirilmiştir (Wang ve Xie, 2020).



(A)

(B)



(C)

(D)

Şekil 4.8: Kekik Yağının YB 91 Suşunun 4°C (A) ve 25°C’de (B) Biyofilm Üretimi ile 4°C (C) ve 25°C’de (D) Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Dikey çubuklardaki küçük harfler, aynı gün ve sıcaklıktaki farklı kekik yağı konsantrasyonları arasındaki, büyük harfler aynı gün ve kekik yağı konsantrasyondaki farklı sıcaklık değerleri arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir ($p < 0,05$).

Mevcut verilere dayanarak, kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol grubuna göre kekik yağının bazı MİK altı konsantrasyonlarda izolatların biyofilm üretimini etkilediği ve önemli ölçüde azalttığı ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Ancak biyofilm oluşumunda her

zaman konsantrasyona bağlı bir azalma gözlenmemiştir. Tüm izolatlar için biyofilm oluşum miktarlarında konsantrasyona bağlı bir azalma beklense de elde edilen sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Pejčić vd. (2020) ve Artini vd. (2018)'in farklı esansiyel yağlar kullanarak *P. aeruginosa* suşunun biyofilm üretimiyle ilgili yaptıkları çalışmalarda esansiyel yağların engelleyici etkisinin olduğunu ancak her zaman konsantrasyona bağlı olarak biyofilm oluşumunda azalmaya neden olmadığını bildirmişlerdir.

Test edilen bazı izolatlarda konsantrasyona bağlı olarak biyofilm üretiminde azaltıcı etki gözlenmemiş bunun aksine kekik yağı uygulanmayan (0) kontrol grubuna göre daha fazla biyofilm üretimi olmuş ve kekik yağı biyofilm üretimini teşvik etmiştir. Bu suşlar; YB91 4°C 1. gün 1/2 - 1/4 MİK ve 25°C 4. gün 1/8 MİK, YK50 4°C 1. gün 1/2 - 1/4 MİK ve 25°C 7. gün, YK8 4°C 7. gün 1/4 MİK ve 25°C 1. gün, *P. fragi* ATCC 4973 25°C 1. gün 1/8 MİK ve 7. gün 1/4 MİK. Çalışmamızla benzer sonuçlar bildiren araştırmalar literatürde mevcut olmakla birlikte bu sonuçların olası nedeninin, yüksek konsantrasyonun bakteri üzerinde strese sebep olması nedeniyle bakterinin yanıt olarak EPS üretimini artırması, yapışmanın artması ve toksisiteye yanıt olduğu tahmin edilmektedir (Aquino ve Stuckey, 2004; Niu ve Gilbert, 2004; Fang, Xu ve Chan, 2002). Aynı zamanda çeşitli bitki metabolitlerinin, *P. aeruginosa* ve klinik *Pseudomonas* izolatlarının biyofilm üretimini teşvik edici etkiye neden olduğunu ve biyofilm oluşumunu arttırdığını bildirilen çalışmalar da literatürde mevcuttur (Pejčić vd., 2020; Zodrow, Schiffman ve Elimelech, 2012; Sandasi vd., 2011).

Elde edilen verilere göre kekik yağının MİK altı konsantrasyonlarının, *Pseudomonas* izolatlarının biyofilm üretimi üzerinde inhibitör bir etkisi olduğu, özellikle yüksek konsantrasyonda (1/2 MİK) bu etkinin daha belirgin olduğu sonucu çıkarılabilir. Bu sonuç, kekik esansiyel yağının *Pseudomonas* türü bakterilerin mikrobiyal biyofilm oluşumunu engelleyici potansiyele sahip olduğunu bir kez daha kanıtlamaktadır (Carezzano vd., 2017; Myszka vd., 2016; Kavanaugh ve Ribbeck, 2012). Özetle sonuç olarak, kekik yağının MİK altı konsantrasyonlarda planktonik hücre büyümesini ve biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür ($p < 0,05$).

4.4 Kekik Yağının *Pseudomonas* İzolatlarının Hareketliliği Üzerindeki Etkisi

Hareketlilik testleri için, seğirme, kaynaşma ve yüzme hareket testlerine özel agar hazırlanıp 1/2, 1/4, 1/8 MİK altı konsantrasyonlarında kekik yağı ile %0,5 (v/v) Tween 80 eklenmiştir. Kontrol sadece %0,5 (v/v) Tween 80 içermektedir.

Tablo 4.3'te referans suşlar ve izolatların seğirme hareketi bölge çapları (mm) verilmiştir. Bu veriler MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağının, izolatların seğirme hareketini kontrole kıyasla önemli ölçüde azalttığını ($p < 0,05$) göstermektedir. Tablo 4.4'te ise YB43 suşunun agar üzerindeki seğirme hareketi görünümü ve kekik yağı konsantrasyonuna bağlı olarak hareket çapındaki azalmanın net bir şekilde gözlemlendiği görülmektedir.



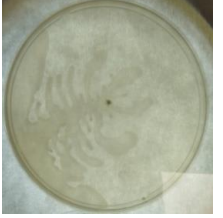

Tablo 4.3: Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarında *Pseudomonas* Suşlarının Seğirme Hareketi Bölge Çapları (mm)

İzolatlar	1/2 MİK	1/4 MİK	1/8 MİK	Kontrol
ATCC 27853	5,50 ± 3,54 ^b	8,00 ± 0,00 ^b	8,00 ± 0,00 ^b	40,00 ± 0,00 ^a
ATCC 4973	6,50 ± 0,56 ^b	9,33 ± 0,25 ^{a,b}	10,67 ± 1,10 ^a	12,00 ± 2,0 ^a
YK 8	6,75 ± 0,50 ^b	6,50 ± 0,71 ^b	7,50 ± 0,71 ^{a,b}	8,67 ± 0,58 ^a
YK 50	6,00 ± 0,00 ^b	6,75 ± 0,50 ^b	8,67 ± 1,16 ^a	9,33 ± 0,58 ^a
YK 107	5,33 ± 0,58 ^b	7,00 ± 1,00 ^b	8,33 ± 0,58 ^{a,b}	11,33 ± 2,31 ^a
YB 43	21,00 ± 1,41 ^d	38,75 ± 9,07 ^c	61,67 ± 2,89 ^b	81,00 ± 1,41 ^a
YB 91	4,50 ± 0,71 ^b	7,00 ± 1,41 ^{a,b}	7,66 ± 0,58 ^{a,b}	10,5 ± 2,12 ^a

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Veriler ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir. ANOVA ($p < 0,05$) ve ardından Tukey Testi yapılmıştır. Aynı satırda farklı küçük harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.4: YB 43 Suşunun Seçirme Hareketine Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarının Etkisinin Agarda Görünümü

İzolot	1/2 MİK	1/4 MİK	1/8 MİK	Kontrol
YB 43				

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.5'te referans suşlar ve izolatların kaynaşma hareketi bölge çapları (mm) verilmiştir. Elde edilen veriler, kontrolle karşılaştırıldığında MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağının, izolatların kaynaşma hareketini önemli ölçüde azalttığını ($p < 0,05$) ortaya koymaktadır. Tablo 4.6'da ise YK107 suşunun agar üzerindeki kaynaşma hareketi görünümü sunulmuş olup, kekik yağı konsantrasyonuna bağlı olarak hareket çapındaki azalma belirgin şekilde gözlemlenmektedir.

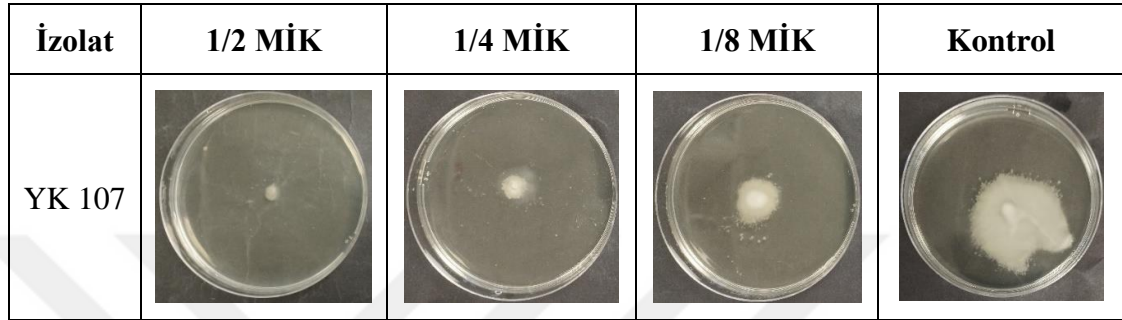
Tablo 4.5: Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarında *Pseudomonas* Suşlarının Kaynaşma Hareketi Bölge Çapları (mm)

İzolatlar	1/2 MİK	1/4 MİK	1/8 MİK	Kontrol
ATCC 27853	12,50 ± 3,54 ^b	16,50 ± 2,12 ^b	15,00 ± 1,41 ^b	32,50 ± 3,54 ^a
ATCC 4973	35,50 ± 0,70 ^b	35,33 ± 4,16 ^b	44,50 ± 0,70 ^{ab}	46,33 ± 3,21 ^a
YK 8	21,00 ± 5,66 ^b	23,33 ± 2,89 ^b	26,50 ± 0,71 ^b	39,30 ± 3,21 ^a
YK 50	3,25 ± 0,50 ^c	3,75 ± 0,50 ^c	6,00 ± 1,41 ^b	12,00 ± 0,00 ^a
YK 107	6,50 ± 2,12 ^c	9,50 ± 0,71 ^{b,c}	16,50 ± 2,12 ^b	42,25 ± 2,87 ^a
YB 43	32,00 ± 5,66 ^c	46,67 ± 2,89 ^b	49,00 ± 3,37 ^b	60,75 ± 6,50 ^a
YB 91	7,00 ± 1,73 ^c	18,00 ± 2,83 ^b	44,00 ± 2,83 ^a	50,00 ± 4,24 ^a

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Veriler ortalama değer \pm standart sapma olarak verilmiştir. ANOVA ($p < 0.05$) ve ardından Tukey Testi yapılmıştır. Aynı satırda farklı küçük harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.6: YK 107 Suşunun Kaynaşma Hareketine Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarının Etkisinin Agarda Görünümü



Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.7’de referans suşlar ve izolatların yüzme hareketi bölge çapları (mm) verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kontrole göre MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağının izolatların yüzme hareketini önemli ölçüde azalttığını ($p < 0,05$) göstermektedir.

Tablo 4.7: Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarında *Pseudomonas* Suşlarının Yüzme Hareketi Bölge çapları (mm)

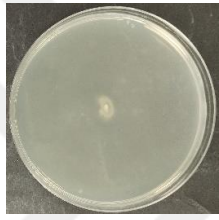


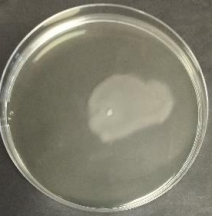
İzolotlar	1/2 MİK	1/4 MİK	1/8 MİK	Kontrol
ATCC 27853	12,50 \pm 3,54 ^b	13,50 \pm 4,95 ^{ab}	16,50 \pm 2,12 ^{ab}	26,50 \pm 2,12 ^a
ATCC 4973	15,00 \pm 4,24 ^b	17,00 \pm 4,24 ^b	18,00 \pm 5,66 ^b	47,00 \pm 2,65 ^a
YK 8	8,50 \pm 2,12 ^b	9,50 \pm 0,71 ^b	12,00 \pm 0,00 ^b	22,50 \pm 0,71 ^a
YK 50	6,00 \pm 1,41 ^b	7,50 \pm 0,71 ^{ab}	7,70 \pm 0,58 ^{ab}	11,00 \pm 1,41 ^a
YK 107	9,00 \pm 0,00 ^b	10,50 \pm 2,12 ^b	12,56 \pm 3,54 ^b	20,00 \pm 1,00 ^a
YB 43	16,50 \pm 2,12 ^b	26,00 \pm 2,83 ^b	22,50 \pm 3,54 ^b	55,67 \pm 4,04 ^a
YB 91	8,00 \pm 1,73 ^b	9,00 \pm 1,41 ^b	11,67 \pm 2,89 ^b	38,00 \pm 4,24 ^a

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Veriler ortalama değer \pm standart sapma olarak verilmiştir. ANOVA ($p < 0.05$) ve ardından Tukey Testi yapılmıştır. Aynı satırda farklı küçük harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.8’de YB91 suşunun agar üzerindeki yüzme hareketi görünümü verilmiş olup, kekik yağı konsantrasyonuna bağlı olarak hareket çapındaki azalma belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir.

Tablo 4.8: YB 91 Suşunun Yüzme Hareketine Farklı Kekik Yağı Konsantrasyonlarının Etkisinin Agarda Görünümü

İzolat	1/2 MİK	1/4 MİK	1/8 MİK	Kontrol
YB 91				

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Hareket testlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MİK altı konsantrasyonlarda önemli azalmalar ($p < 0,05$) elde edilmiştir. Kekik esansiyel yağının yüzme, kaynaşma ve seğirme hareketliliği üzerinde engelleyici bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Kekik esansiyel yağının, izolatların hareket kabiliyetleri üzerindeki inhibe edici etkisinin kekik yağı konsantrasyonuna bağlı olduğu söylenebilmektedir. Kekik yağı konsantrasyonu arttıķa 7 suşun koloni çapları kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. Sonuç olarak, *Pseudomonas* suşlarının hareketliliğinin kekik esansiyel yağı ile önemli ölçüde inhibe edilebildiği görülmüştür.

Çalışmamızla uyumlu olarak Liu vd. (2020) ile Qaralleh (2019) tarafından yapılan çalışmalarda, kekik esansiyel yağının bakterilerin yüzme ve kaynaşma hareketlerini sınırlayabildiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, Carezzano vd. (2023) kekik esansiyel yağının *Pseudomonas* türlerinin hareketliliğini inhibe edebildiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, elde edilen bulguların diğer çalışmalarla tutarlı olduğu görülmektedir.

Kekik yağının, üropatojenik *E. coli*’nin biyofilm oluşumunu %60’tan fazla inhibe ettiği ve bu etkinin doza bağlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Lee, Kim ve Lee, 2017). Aynı çalışmada, üropatojenik *E. coli*’nin kaynaşma hareketliliğinin kontrol

grubuna kıyasla azaldığı ancak yüzme hareketinin engellenemediği de rapor edilmiştir. Ayrıca *E. coli*'nin biyofilm oluşumunun inhibisyonunda, yüzme hareketinden ziyade kaynaşma hareketinin engellenmesinin daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bakteriyel hareketliliğin azalması, bakterinin yüzeye bağlanmasını zorlaştırarak biyofilm oluşumunun engellenmesine katkıda bulunabilir.

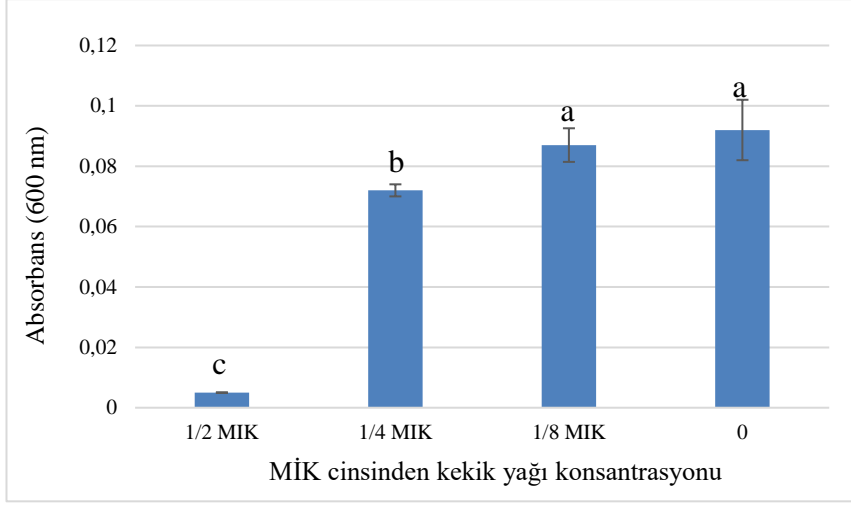
4.5 Kekik Yağının *Pseudomonas* İzolatlarının AI-2 Üretimi Üzerine Etkisi

YK50, YK107 ve YB91 izolatlarının AI-2 üretimi, hücre süpernatantlarının AI-2 biyosensörü *V. campbellii* BAA-1117 suşunda luminesans oluşturması vasıtasıyla belirlenmiştir. AI-2 üreticisi *V. campbellii* BAA-1119 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. AI-2 ürettiği tespit edilen YK50, YK107 ve YB91 izolatları seçilmiş ve izolatların AI-2 üretimine kekik yağının etkisi belirlenmiştir.

YK50 suşunun MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağı içeren LB besiyerinde 6 saatlik inkübasyon sonrasında, planktonik hücrelerin gelişme grafiği Şekil 4.9'da, AI-2 aktivitesi Şekil 4.10'da verilmiştir. Işıma miktarı LCS (light count per second) olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.9'a göre kekik yağı konsantrasyonu arttıkça YK50 suşunun hücre yoğunluğunun 1/4 MİK'ten itibaren azaldığı ve kekik yağı eklenmemiş kontrol ile (0) karşılaştırıldığında 1/2 ve 1/4 alt-MİK konsantrasyonlarında kekik yağı eklenen örneklerde planktonik hücre gelişiminde önemli düzeyde ($p < 0,05$) azalma olduğu söylenebilmektedir. 1/8 MİK ve kontrol (0) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$). Buna rağmen Şekil 4.10'a göre 1/8 MİK grubunda ışımada olmaması düşük konsantrasyonda bile AI-2 aktivitesinin önemli ölçüde inhibe edilebildiğini ortaya koymaktadır ($p < 0,05$).

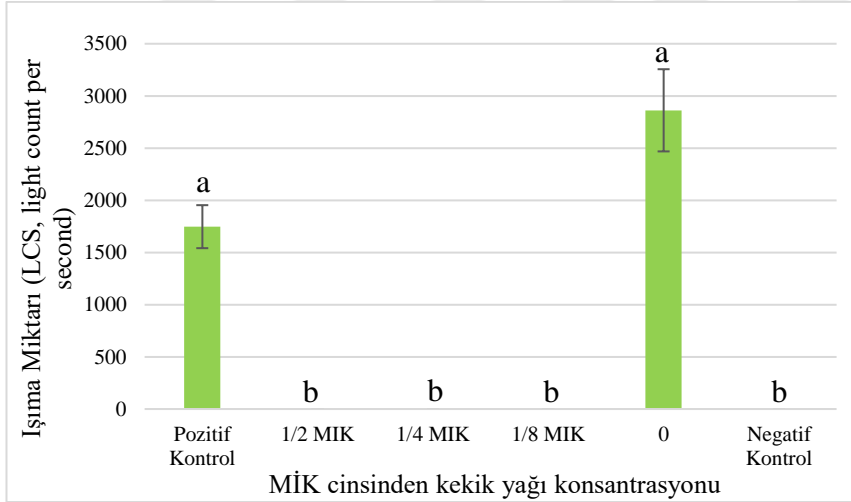
Şekil 4.10'a göre eklenen üç kekik yağı konsantrasyonunda da YK50 suşunda AI-2 aktivitesi gözlenmemiştir. Bu durum, kekik yağının YK50 suşunun AI-2 aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe edebildiğini ortaya koymaktadır. AI-2 üreticisi ve pozitif kontrol suşu *V. campbellii* BAA-1119 ile kekik yağı uygulanmayan kontrol (0) örneği arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ki bu durum YK50 suşunun, uygulanan deneysel koşullarda pozitif AI-2 üreticisi suş kadar AI-2 ürettiğini göstermektedir ($p > 0,05$).



Şekil 4.9: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 50 Suşunun Planktonik Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Farklı harfler, örnekler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).



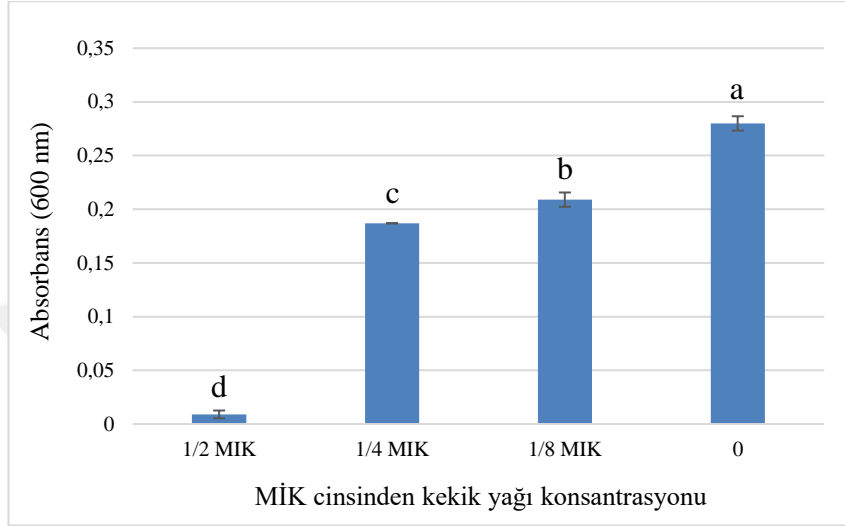
Şekil 4.10: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 50 Suşunun AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Farklı harfler, örnekler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

YK107 suşunun MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağı içeren LB besiyerinde 6 saatlik inkübasyonu sonrasında, planktonik hücrelerin gelişme grafiği Şekil 4.11’de, AI-2 aktivitesi Şekil 4.12’de verilmiştir.

Şekil 4.11'e göre kekik yağı konsantrasyonu arttıkça YK107 suşunun hücre yoğunluğunun azaldığı ve kontrol (0) ile karşılaştırıldığında kullanılan tüm alt-MİK konsantrasyonlarında planktonik hücre gelişiminde önemli düzeyde ($p<0,05$) azalma görülmektedir.

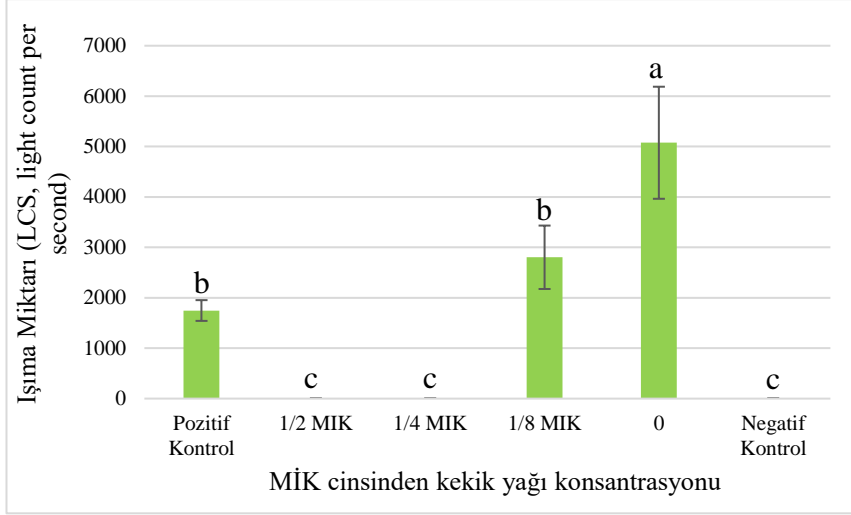


Şekil 4.11: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 107 Suşunun Planktonik Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Farklı harfler, örnekler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Şekil 4.12'ye göre kontrol (0) ile karşılaştırıldığında eklenen alt-MİK konsantrasyonlarında kekik yağı ile ışınım miktarının önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte 1/2 MİK ve 1/4 MİK konsantrasyonlarında AI-2 aktivitesi gözlenmemiştir. Bu durum, kekik yağının YK107 suşunun AI-2 aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe edebildiğini ortaya koymaktadır. En yüksek ışınım miktarı kekik yağı uygulanmayan (0) kontrolde gözlemlenmiştir. Aynı zamanda pozitif kontrol suşu ile kekik yağı uygulanmayan kontrol (0) grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ki bu durum YK107 suşunun, pozitif AI-2 üreticisi suştan uygulanan şartlarda daha fazla AI-2 aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YK 107 Suşunun AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

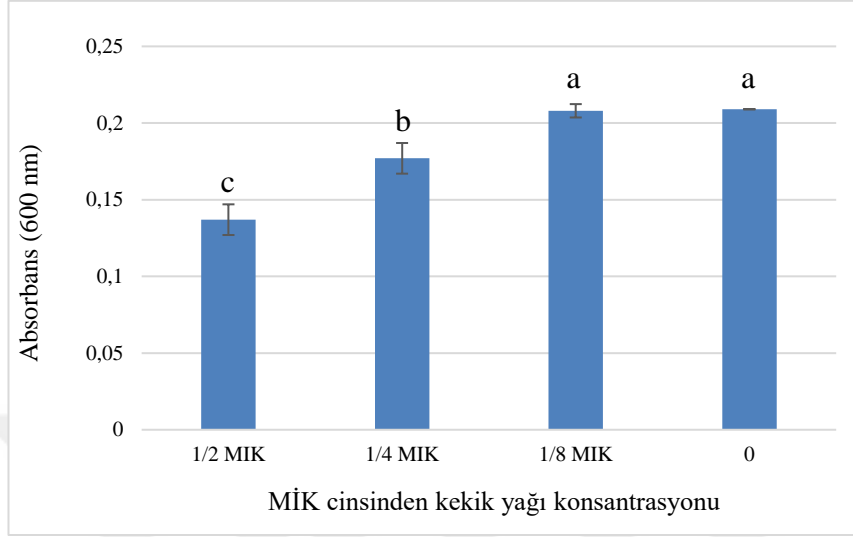
*Farklı harfler, örnekler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

YB91 suşunun MİK altı konsantrasyonlarda kekik yağı içeren LB besiyerinde 6 saatlik inkübasyon sonrasında, planktonik hücrelerin gelişme grafiği Şekil 4.13'te, AI-2 aktivitesi Şekil 4.14'te verilmiştir.

Şekil 4.13'e göre kekik yağı konsantrasyonu arttıkça YB91 suşunun hücre yoğunluğunda 1/4 MİK konsantrasyonundan itibaren azalma gözlemlendiği ve kekik yağı eklenmemiş kontrol ile karşılaştırıldığında eklenen 1/2 ve 1/4 alt-MİK konsantrasyonlarında kekik yağı ile planktonik hücre gelişiminde önemli düzeyde ($p < 0,05$) azalma olduğu söylenebilmektedir. Ancak 1/8 MİK ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Şekil 4.14'e göre YB91 suşunun kontrole (0) kıyasla eklenen tüm alt-MİK kekik yağı konsantrasyonlarında ışımada önemli düzeyde azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Buna ek olarak 1/2 MİK konsantrasyonunda AI-2 aktivitesi tespit edilememiştir. Bu bulgular, kekik yağının YB91 suşunun AI-2 aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe edebildiğini göstermektedir. En yüksek ışımada kekik yağı uygulanmamış (0) kontrolde gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol suşu ile kekik yağı uygulanmayan kontrol (0) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir; bu durum YB91 suşunun, pozitif AI-2 üreticisi suşa göre uygulanan

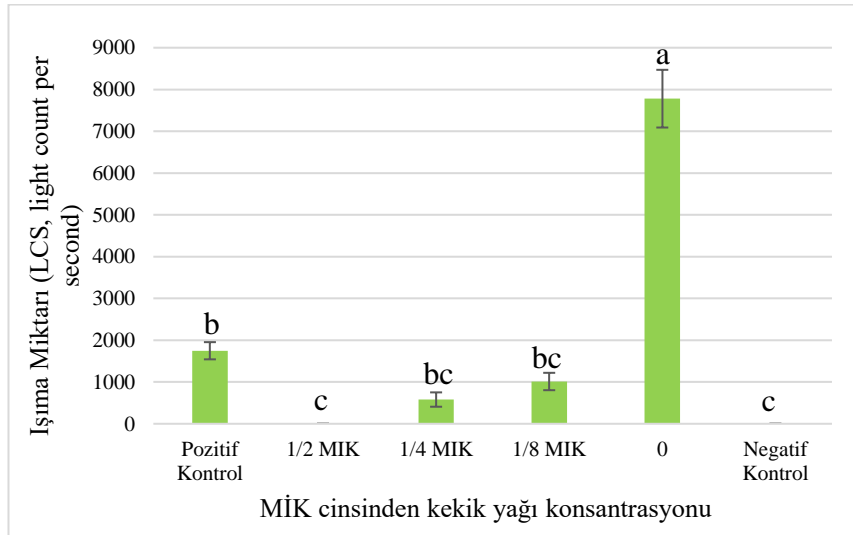
deneysel koşullarda çok daha fazla miktarda AI-2 aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.13: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YB 91 Suşunun Planktonik Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Farklı harfler, örnekler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.14: MİK Altı Konsantrasyonlarda Kekik Yağının YB 91 Suşunun AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

*Farklı harfler, örnekler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

Yapılan analizler sonucunda, kekik yağının YK50, YK107 ve YB91 izolatlarının planktonik hücre gelişimini azalttığı ve AI-2 aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir (p<0,05). Aynı zamanda kekik yağının izolatlarının hem gelişimini hem de AI-2 aktivitesini konsantrasyona bağlı olarak azalttığı veya inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Bozulmuş etten izole edilen *Pseudomonas* izolatlarında AI-2 aktivitesi ve QS mekanizmasıyla ilgili literatürdeki çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, elde edilen veriler daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermiş ve izolatların AI-2 ürettiği ortaya konmuştur (Zhao vd., 2016; Feerocino vd., 2009).

Luciardi vd. (2016)'nın yaptıkları çalışmada mandalina (*Citrus reticulata*) esansiyel yağının, *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'nın QS otoindükleyici (AHL) üretimini, biyofilm oluşumunu, elastaz B (LasB) enzimini inhibe ettiğini ve biyofilm oluşumunun engellenmesinin QS inhibisyonundan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Karanfil, kekik ve sarımsak yağının, deniz ürünlerinde bulunabilen *V. parahaemolyticus*'un hareketlilik, biyofilm oluşumu ve QS üzerindeki etkisi araştırılan bir çalışmada ise biyofilm oluşumu ile hareketliliğin önemli ölçüde engellendiği, aynı zamanda AI-2 sinyal molekülünün seviyesinin azaldığı belirtilmiştir (Mizan vd., 2020). Zhang vd. (2022)'in yaptığı diğer bir çalışmada, hekzanalın sebzedden izole edilen *P. fluorescens* tarafından salgılanan AI-2 sinyal molekülünü önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kekik (*Thymus vulgaris*) yağının, etten elde edilen *Pseudomonas* izolatlarının bozucu faaliyetleri (biyofilm oluşumu, bakteriyel hareketlilik) ve AI-2 aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler aşağıda özetlendiği gibidir.

Tez çalışmasında kullanılmak üzere satın alınan ticari kekik yağının uçucu bileşenleri, GC-MS analiziyle tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kekik esansiyel yağının temel uçucu bileşenleri timol (%20.69), p-cymene (%33.29), β -myrcene (%15.15) ve γ -terpinene (%16.77) olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, kekik yağının, *Pseudomonas* türlerinin bozucu faaliyetleri üzerine etkisini incelemek için etten elde edilen toplam 5 *Pseudomonas* izolatı (YK8, YK50, YK107, YB43, YB91) ve 2 referans suş (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973) kullanılmıştır. Kekik yağının bu suşlar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri %0,1-0,5 (v/v) arasında bulunmuştur. Kekik yağının bozucu etkilere olan etkisini değerlendirmek için, analizler izolatların kekik yağı içermeyen ve 1/2, 1/4 ve 1/8 alt MİK değerinde kekik yağı içeren ortamda geliştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre gelişimi ve biyofilm üretimi mikroparka yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmiş ve kekik yağının *Pseudomonas* izolatlarının planktonik hücrelerine karşı etkili bir antimikrobiyal ajan olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yağın izolatların biyofilm üretimini azaltmada önemli ölçüde etkili olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Kekik yağının bakteriyel hareketlilik üzerindeki etkisini saptamak için seğirme, kaynaşma ve yüzme hareketleri için özel olan agarlara kekik yağı eklenmeden ve belirli oranlarda eklenerek ekimler yapılmış ve oluşan zon bölgelerinin çapları (mm) ölçülmüştür. Kekik yağı içeren agarlardaki bölge çapı ile kekik yağı eklenmeyen kontrol grubunun bölge çapı kıyaslanmış ve kekik yağlı petrilerde bakteriyel harekette önemli azalmalar ($p<0,05$) elde edilmiştir. Aynı zamanda kekik yağı

konsantrasyonu arttıkça bakteri hareketliliğinin önemli ölçüde azaldığı da gözlemlenmiştir.

Kekik esansiyel yağının, *Pseudomonas* izolatlarının AI-2 aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, kekik yağı eklenmemiş ve belirli konsantrasyonlarda kekik yağı içeren LB besiyerinde 6 saat inkübe edilen izolatların AI-2 üretimi, AI-2 biyosensör suşu *V. campbellii* kullanılarak belirlenmiştir. Kekik yağının *Pseudomonas* izolatlarının planktonik hücre gelişimini azalttığı ve AI-2 aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Etten izole edilen *Pseudomonas* suşlarında QS sistemi ve AI-2 sinyal molekülünün üretimi ve kekik yağı ile AI-2 üretiminin inhibisyonuna yönelik literatür bilgisi şu an için sınırlı olsa da elde edilen bulgular umut vericidir. AI-2'nin esansiyel yağlarla inhibisyonu konusunda daha kapsamlı araştırmalar yapılarak bu etkinliğin doğrulanması gerekmektedir. Özellikle etten izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının AI-2 üretim mekanizması ve bu süreçteki bozulma dinamiklerinin olası rolü daha fazla araştırma gerektirmektedir.

Gıdalarda ve özellikle buzdolabı şartlarında depolanan taze etlerde bozulmaya ve kontaminasyona neden olan psikrotrofik *Pseudomonas* türlerinin bozucu faaliyetlerini ve bu faaliyetlerin inhibisyonunu araştırmak gıda kontaminasyonu ve bozulmalarının engellenmesinde önemli bir adımdır. Elde edilen sonuçlar kekik esansiyel yağının gıda endüstrisinde etkin *Pseudomonas* türlerine karşı korunması ve raf ömrünün arttırılması amacıyla potansiyel kullanımını doğrulamaktadır. Özellikle taze etlerde kekik yağının kullanımı ile hem koruyucu hem de organoleptik bir etki sağlanabilir. Sonuç olarak kekik yağının etkin bozulma sürecinin kontrolünde kullanılabilir etkili, ekolojik ve sürdürülebilir bir alternatif olduğu söylenebilir.

Dünyada antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç artmakta ve geliştirilen direncin yakın gelecekte büyük bir tehdit olacağı öngörülmektedir. Bu nedenle doğal antimikrobiyal esansiyel yağların kullanımı önem taşımaktadır. Bakterilerin direnç geliştirdiği antibiyotiklerin kullanımından ziyade antimikrobiyal ve anti-biyofilm özelliklere sahip olduğu bilinen esansiyel yağların kullanılması ve bu yağların uygulanma alanlarının geliştirilmesi günümüzde oldukça önem taşımaktadır. Çoklu ilaç dirençli bakterilerin, ilaç direnci geliştirmeden biyofilm oluşumunu ve gıda bozulmalarını engellemek için kekik esansiyel yağının alternatif temsil edebilecek doğal bir ürün olduğu literatürdeki araştırmalar ve tez çalışması ile gösterilmiştir.

Biyofilm oluşumu, EPS üretimi ve ette bozulmaya neden olan *Pseudomonas* türleri arasında yer alan *P. fragi* ile *P. bubulae* ve *P. kulmbachensis* gibi yeni *Pseudomonas* türlerinin quorum algılama mekanizması, AI-2 ve biyofilm üretimi hakkında çok az şey bilinmektedir. Aynı zamanda kekik esansiyel yağının AI-2 üretimini inhibe etme mekanizmasını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. QS mekanizması ve bozucu faaliyetler arasındaki ilişkinin, gıda bozulması ve gıda güvenliğindeki rolü daha kapsamlı bir şekilde araştırılmalı ve aydınlatılmalıdır. Böylelikle gelecekteki araştırmalarda ette bozulmaya neden olan mekanizmaların anlaşılmasına, bozulma reaksiyonlarının azaltılmasına veya önlenmesine yardımcı olunacaktır.



KAYNAKÇA

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183.
- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *MBio*, 9(3), e02331-17.
- Ahmed, S. O., Zedan, H. H., & Ibrahim, Y. M. (2021). Quorum sensing inhibitory effect of bergamot oil and aspidosperma extract against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4663-4675.
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601-611.
- Alibi, S., Selma, W. B., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., ... & Mansour, H. B. (2020). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, 68(2), 59-66.
- Anbu, P. (2013). Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *International Journal of Biological Macromolecules*, 56, 162-168.
- Aquino, S. F., & Stuckey, D. C. (2004). Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*, 38(2), 255-266.
- Artini, M., Patsilnakos, A., Papa, R., Božović, M., Sabatino, M., Garzoli, S., ... & Selan, L. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity and machine learning classification analysis of essential oils from different mediterranean plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 23(2), 482.

- Bakó, C., Balázs, V. L., Kerekes, E., Kocsis, B., Nagy, D. U., Szabó, P., ... & Horváth, G. (2023). Flowering phenophases influence the antibacterial and anti-biofilm effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 168.
- Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell*, 125(2), 237-246.
- Bassler, B. L., Wright, M., & Silverman, M. R. (1994). Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology*, 13(2), 273-286.
- Becerril, R., Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(8), 699-705.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Burmølle, M., Hentzer, M., Haagensen, J. A., Hougen, H. P., ... & Givskov, M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, 151(2), 373-383.
- Blana, V. A. (2010). *Quorum sensing: understanding the role of bacteria in meat spoilage* (Unpublished PhD Dissertation). Cranfield University, Bedfordshire.
- Blana, V. A., & Nychas, G. J. E. (2014). Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 1-8.
- Blus-Kadosh, I., Zilka, A., Yerushalmi, G., & Banin, E. (2013). The effect of pstS and phoB on quorum sensing and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*, 8(9), e74444.
- Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1210-1223.
- Borges, A., Simões, L. C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2014). The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 25-33.

- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleş, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7(Spec Iss 3), 56.
- Boskovic, M., Djordjevic, J., Ivanovic, J., Janjic, J., Zdravkovic, N., Glisic, M., ... & Baltic, M. (2017). Inhibition of *Salmonella* by thyme essential oil and its effect on microbiological and sensory properties of minced pork meat packaged under vacuum and modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 258, 58-67.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147.
- Caldera, L., Franzetti, L. V., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142-153.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Carezzano, M. E., Paletti Rovey, M. F., Sotelo, J. P., Giordano, M., Bogino, P., Oliva, M. D. L. M., & Giordano, W. (2023). Inhibitory potential of *Thymus vulgaris* essential oil against growth, biofilm formation, swarming, and swimming in *Pseudomonas syringae* isolates. *Processes*, 11(3), 933.
- Carezzano, M. E., Sotelo, J. P., Primo, E., Reinoso, E. B., Paletti Rovey, M. F., Demo, M. S., ... & Oliva, M. D. L. M. (2017). Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology*, 19(4), 599-607.
- Cathcart, G. R., Gilmore, B. F., Greer, B., Harriott, P., & Walker, B. (2009). Inhibitor profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB

- using N-alpha mercaptoamide template-based inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(21), 6230-6232.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1119-1129.
- Conner, D. E. (1993). Naturally occurring compounds. *Antimicrobials in Foods*, 441-468.
- Costerton, J. W., & Stewart, P. S. (2001). Battling biofilms. *Scientific American*, 285(1), 74-81.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 435-464.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 711-45.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137-2142.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1641.
- Craig, L., Pique, M. E., & Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 363-378.
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498.
- Dai, J., Bai, M., Li, C., Cui, H., & Lin, L. (2020). Advances in the mechanism of different antibacterial strategies based on ultrasound technique for controlling bacterial contamination in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 211-222.

- Datta, N., & Deeth, H. C. (2001). Age gelation of UHT milk—a review. *Food and Bioproducts Processing*, 79(4), 197-210.
- De Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839-4849.
- Delaquis, P. J., & McCurdy, A. R. (1990). Colonization of beef muscle surfaces by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi*. *Journal of Food Science*, 55(4), 898-902.
- Déziel, E., Comeau, Y., & Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1195-1204.
- Dickson, J. S. (1989). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on beef tissue surfaces as affected by simulated processing conditions. *Journal of Food Safety*, 10(3), 165-174.
- Diniz, A. F., Santos, B., Nóbrega, L. M. M. O., Santos, V. R. L., Mariz, W. S., Cruz, P. S. C., ... & Oliveira-Filho, A. A. (2023). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat product. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e275306.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30-36.

- Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., & Surette, M. G. (2003). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1477-1491.
- Egan, S., James, S., Holmström, C., & Kjelleberg, S. (2002). Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environmental Microbiology*, 4(8), 433-442.
- El-Hosseiny, L., El-Shenawy, M., Haroun, M., & Abdullah, F. (2014). Comparative evaluation of the inhibitory effect of some essential oils with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antibiotics*, 2014.
- El-Tarabily, K. A., El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., ... & Abd El-Hack, M. E. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5145-5156.
- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., ... & Villani, F. (2010). Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 120-131.
- Fang, H. H., Xu, L. C., & Chan, K. Y. (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, 36(19), 4709-4716.
- Ferrocino, I., Ercolini, D., Villani, F., Moorhead, S. M., & Griffiths, M. W. (2009). *Pseudomonas fragi* strains isolated from meat do not produce N-acyl homoserine lactones as signal molecules. *Journal of Food Protection*, 72(12), 2597-2601.
- Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 685-695.
- Gacesa, P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis—recent progress and future prospects. *Microbiology*, 144(5), 1133-1143.
- Galasso, S., Pacifico, S., Kretschmer, N., Pan, S. P., Marciano, S., Piccolella, S., ... & Bauer, R. (2014). Influence of seasonal variation on *Thymus longicaulis* C. Presl chemical composition and its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*, 107, 80-90.

- Ganeshan, G., & Manoj Kumar, A. (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*, 1(3), 123-134.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049-1056.
- Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 332-339.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretør, T., ... & Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 298-309.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., ... & Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology*, 178(22), 6618-6622.
- Gonçalves, L. D. dos A., Piccoli, R. H., & Peres, A. de P. (2017). Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 352-358.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 79-97.
- Guenther, E. (1950). *The Essential Oils: Individual Essential Oils of the Plant Families Gramineae, Lauraceae...* D. van Nostrand.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198, 1-15.

- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 249-273.
- Hébraud, M., Dubois, E., Potier, P., & Labadie, J. (1994). Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 4017-4024.
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300-1307.
- Herrera-Estrella, L., & Simpson, J. (1995). Genetically engineered resistance to bacterial and fungal pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 383-392.
- Huang, H., Ren, H., Ding, L., Geng, J., Xu, K., & Zhang, Y. (2014). Aging biofilm from a full-scale moving bed biofilm reactor: characterization and enzymatic treatment study. *Bioresource Technology*, 154, 122-130.
- Husain, F. M., Ahmad, I., Asif, M., & Tahseen, Q. (2013). Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biosciences*, 38, 835-844.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986-995.
- Hylgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 20029.
- Gün, İ., & Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.

- İnat, G., Sırıken, B., Başkan, C., Erol, İ., Yıldırım, T., & Çiftci, A. (2021). Quorum sensing systems and related virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chicken meat and ground beef. *Scientific Reports*, *11*(1), 15639.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, *81*(1), 7-11.
- Jansen, K. U., Knirsch, C., & Anderson, A. S. (2018). The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. *Nature Medicine*, *24*(1), 10-19.
- Jaramillo-Colorado, B., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. E., Wagner-Döbler, I., & Kunze, B. (2012). Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Natural Product Research*, *26*(12), 1075-1086.
- Jay, J. M., Vilai, J. P., & Hughes, M. E. (2003). Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 C. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(2), 105-111.
- Jiang, K., Xu, Y., Yuan, B., Yue, Y., Zhao, M., Luo, R., ... & Lin, F. (2022). Effect of autoinducer-2 quorum sensing inhibitor on interspecies quorum sensing. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 791802.
- Kang, J., Liu, L., Wu, X., Sun, Y., & Liu, Z. (2018). Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and biofilm formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 10209-10218.
- Karaboz, İ., & Sukatar, A. (2004). Bakterilerde sosyal davranışlar (bakterilerde iletişim mekanizmaları). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, *2*(5), 23-32.
- Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(11), 4057-4061.
- Kerekes, E. B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2013). Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(4), 933-942.
- Kerekes, E. B., Vidács, A., Takó, M., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., Horváth, G., ... & Krisch, J. (2019). Anti-biofilm effect of selected essential oils and main

- components on mono-and polymicrobial bacterial cultures. *Microorganisms*, 7(9), 345.
- Khan, F., Javaid, A., & Kim, Y. M. (2019). Functional diversity of quorum sensing receptors in pathogenic bacteria: Interspecies, intraspecies and interkingdom level. *Current Drug Targets*, 20(6), 655-667.
- Kirov, S. M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 224(2), 151-159.
- Kiyimaci, M. E., Altanlar, N., Gumustas, M., Ozkan, S. A., & Akin, A. (2018). Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. *Microbial Pathogenesis*, 121, 190-197.
- Klaenhammer, T. R., & Fitzgerald, G. F. (1994). Bacteriophages and bacteriophage resistance. *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 106-168.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Kolter, R., Siegele, D. A., & Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology*, 47, 855-875.
- Kuleasan, H., & Çakmakçı, M. L. (2003). Bakteriyosinlerin özellikleri, gıda mikrobiyolojisinde kullanım alanları ve ileri dönemlerdeki kullanım potansiyelleri. *Gıda*, 28(2).
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 9-27.
- Kumar, L., Chhibber, S., Kumar, R., Kumar, M., & Harjai, K. (2015). Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia*, 102, 84-95.
- Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20-29.

- Küçükata, Y. Ş., Yetim, H., & Metin, B. (2024). Et ve et ürünlerinde *Pseudomonas* biyoçeşitliliği, bozucu özellikleri, biyofilm üretimi ve çoğunluk algılama (quorum sensing) sistemi. *Gıda*, 49(4), 607-623.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52(3), 299-305.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., & Lee, J. (2017). Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1420-1428.
- Lemos, M. F., Lemos, M. F., Pacheco, H. P., Guimarães, A. C., Fronza, M., Endringer, D. C., & Scherer, R. (2017). Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, 95, 543-548.
- Li, H., Li, X., Wang, Z., Fu, Y., Ai, Q., Dong, Y., & Yu, J. (2015). Autoinducer-2 regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation and virulence production in a dose-dependent manner. *BMC Microbiology*, 15, 1-8.
- Li, T., Yang, B., Li, X., Li, J., Zhao, G., & Kan, J. (2018). Quorum sensing system and influence on food spoilage in *Pseudomonas fluorescens* from turbot. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3016-3025.
- Lick, S., Kröckel, L., Wibberg, D., Winkler, A., Blom, J., Goesmann, A., & Kalinowski, J. (2020). *Pseudomonas bubulae* sp. nov., isolated from beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 292-301.
- Lick, S., Wibberg, D., Busche, T., Blom, J., Grimmler, C., Goesmann, A., & Kalinowski, J. (2024). *Pseudomonas kulmbachensis* sp. nov. and *Pseudomonas paraveronii* sp. nov., originating from chilled beef and chicken breast. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(4), 006293.

- Lindsay, D., & Von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.
- Liu, F., Jin, P., Gong, H., Sun, Z., Du, L., & Wang, D. (2020). Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. *Poultry Science*, 99(10), 5127-5136.
- Liu, M., Gray, J. M., & Griffiths, M. W. (2006). Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2729-2737.
- Liu, M., Wang, H., & Griffiths, M. W. (2007). Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2174-2184.
- Liu, Y. J., Xie, J., Zhao, L. J., Qian, Y. F., Zhao, Y., & Liu, X. (2015). Biofilm formation characteristics of *Pseudomonas lundensis* isolated from meat. *Journal of Food Science*, 80(12), M2904-M2910.
- Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Cartagena, E., Bardón, A., & Arena, M. E. (2016). Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 373-380.
- Ma, Y., Shi, Q., He, Q., & Chen, G. (2021). Metabolomic insights into the inhibition mechanism of methyl N-methylanthranilate: A novel quorum sensing inhibitor and antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Food Microbiology*, 358, 109402.
- Manso, S., Pezo, D., Gómez-Lus, R., & Nerín, C. (2014). Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*, 45, 101-108.
- Marić, S., & Vraneš, J. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*, 109, 115-121.
- Martínez-Gil, M., Quesada, J. M., Ramos-González, M. I., Soriano, M. I., de Cristóbal, R. E., & Espinosa-Urgel, M. (2013). Interplay between

- extracellular matrix components of *Pseudomonas putida* biofilms. *Research in Microbiology*, 164(5), 382-389.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 289-314.
- Melville, S., & Craig, L. (2013). Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 77(3), 323-341.
- Michel-Briand, Y., & Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6), 499-510.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., & Forestier, C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. *Frontiers in Microbiology*, 7, 184183.
- Mizan, M. F. R., Ashrafudoulla, M., Hossain, M. I., Cho, H. R., & Ha, S. D. (2020). Effect of essential oils on pathogenic and biofilm-forming *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Biofouling*, 36(4), 467-478.
- Molin, G., Ternström, A., & Ursing, J. (1986). *Pseudomonas lundensis*, a new bacterial species isolated from meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(2), 339-342.
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme* (pp. 15-57). CRC Press.
- Myszka, K., Schmidt, M. T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkowicz, M., & Czaczyk, K. (2016). Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 252-259.
- National Research Council, Committee on Food Protection, & Subcommittee on Microbiological Criteria. (1985). *An evaluation of the role of microbiological criteria for foods and food ingredients*. Washington, D. C.
- Nguyen, N. H. B., Pham, T. T. V., Huynh, T. Q., Nguyen, T. H., & Nguyen, T. T. H. (2022). Sample preparative procedure for *Pseudomonas aeruginosa*

- observation under scanning electron microscope. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(4), 717-726.
- Ni, N., Li, M., Wang, J., & Wang, B. (2009). Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Medicinal Research Reviews*, 29(1), 65-124.
- Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 6951-6956.
- Niu, C., Afre, S., & Gilbert, E. S. (2006). Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), 489-494.
- Norajit, K., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2007). Antibacterial effect of five *Zingiberaceae* essential oils. *Molecules*, 12(8), 2047-2060.
- O'May, C., & Tufenkji, N. (2011). The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3061-3067.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244.
- Ozcan, M., & Chalchat, J. C. (2004). Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30(3-4), 68-73.
- Özkan, M., & Kırca, A. (2001). Gıdalarda hidrojen peroksit uygulamaları. *Gıda*, 26(1).
- Packiavathy, I. A. S. V., Agilandeswari, P., Musthafa, K. S., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2012). Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of

- Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*, 45(1), 85-92.
- Pandur, E., Micalizzi, G., Mondello, L., Horváth, A., Sipos, K., & Horváth, G. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils prepared at different plant phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-activated THP-1 macrophages. *Antioxidants*, 11(7), 1330.
- Parasuraman, P., Devadatha, B., Sarma, V. V., Ranganathan, S., Ampasala, D. R., & Siddhardha, B. (2020). Anti-quorum sensing and antibiofilm activities of *Blastobotrys parvus* PPR3 against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103811.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Genčić, M., Dimitrijević, M., & Radulović, N. (2020). Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111431.
- Perez, A. P., Perez, N., Lozano, C. M. S., Altube, M. J., de Farias, M. A., Portugal, R. V., ... & Romero, E. L. (2019). The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicles. *Phytomedicine*, 57, 339-351.
- Perez, N., Altube, M. J., Barbosa, L. R. S., Romero, E. L., & Perez, A. P. (2022). *Thymus vulgaris* essential oil+ tobramycin within nanostructured archaeolipid carriers: A new approach against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Phytomedicine*, 102, 154179.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3127-3132.
- Pinto, U. M., de Souza Viana, E., Martins, M. L., & Vanetti, M. C. D. (2007). Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control*, 18(10), 1322-1327.

- Pirbalouti, A. G., Hashemi, M., & Ghahfarokhi, F. T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43-48.
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285-293.
- Qaralleh, H. (2019). Thymol rich *Thymbra capitata* essential oil inhibits quorum sensing, virulence and biofilm formation of beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Sciences*, 25(2), 172-180.
- Quintieri, L., Caputo, L., Brasca, M., & Fanelli, F. (2021). Recent advances in the mechanisms and regulation of QS in dairy spoilage by *Pseudomonas* spp. *Foods*, 10(12), 3088.
- Rasmussen, T. B., Manefield, M., Andersen, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., ... & Givskov, M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*, 146(12), 3237-3244.
- Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T., Phipps, R. K., Christensen, K. B., Jensen, P. O., ... & Givskov, M. (2005). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 151(5), 1325-1340.
- Rhodes, M. E. (1959). The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 21(1), 221-263.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681-687.
- Roy, V., Adams, B. L., & Bentley, W. E. (2011). Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 113-123.
- Rumbaugh, K. (2004). The language of bacteria... and just about everything else: secrets to immune and endocrine function may lie in interkingdom communication. *The Scientist*, 18(17), 26-28.

- Sá, R. de C. da S. E., Nalone Andrade, L., dos Reis Barreto de Oliveira, R., & de Sousa, D. P. (2014). A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, *19*(2), 1459-1480.
- Sadekuzzaman, M., Mizan, M. F. R., Kim, H. S., Yang, S., & Ha, S. D. (2018). Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces. *LWT-Food Science and Technology*, *89*, 134-139.
- Sandasi, M., Leonard, C. M., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany*, *77*(1), 80-85.
- Sasahara, K. C., & Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, *56*(12), 1022-1028.
- Schneider, R., Lockett, C. V., Johnson, D., & Belas, R. (2002). Detection and mutation of a *luxS*-encoded autoinducer in *Proteus mirabilis*. *Microbiology*, *148*(3), 773-782.
- Shadel, G. S., & Baldwin, T. O. (1992). Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri luxR* gene. LuxR and autoinducer activate cAMP-catabolite gene activator protein complex-independent and-dependent *luxR* transcription. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(11), 7696-7702.
- Shaw, B. G., & Latty, J. B. (1984). A study of the relative incidence of different *Pseudomonas* groups on meat using a computer-assisted identification technique employing only carbon source tests. *Journal of Applied Microbiology*, *57*(1), 59-67.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 407-413.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., & Parsek, M. R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, *62*(5), 1264-1277.

- Silva, L. V., Galdino, A. C. M., Nunes, A. P. F., dos Santos, K. R., Moreira, B. M., Cacci, L. C., ... & Santos, A. L. (2014). Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 990-1000.
- Simões, M., Simões, L. C., Cleto, S., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2008). The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3), 335-341.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 84(4), 338-345.
- Singh, A., Gupta, R., Tandon, S., & Pandey, R. (2017). Thyme oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 241970
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2012). Quorum sensing in the context of food microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5473-5482.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Novak, J. S. (2004). Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, 67(5), 1053-1070.
- Solano, C., Echeverez, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104.
- Solar Venero, E. C., Ricardi, M. M., Gomez-Lozano, M., Molin, S., Tribelli, P. M., & López, N. I. (2019). Oxidative stress under low oxygen conditions triggers hyperflagellation and motility in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *Extremophiles*, 23, 587-597.
- Song, L., Wu, J., & Xi, C. (2012). Biofilms on environmental surfaces: evaluation of the disinfection efficacy of a novel steam vapor system. *American Journal of Infection Control*, 40(10), 926-930
- Sotelo, J. P., Oddino, C., Giordano, D. F., Carezzano, M. E., & Oliva, M. D. L. M. (2021). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on soybeans seeds infected with *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101735.

- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
- Srinivasan, S., Harrington, G. W., Xagorarakis, I., & Goel, R. (2008). Factors affecting bulk to total bacteria ratio in drinking water distribution systems. *Water Research*, 42(13), 3393-3404.
- Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52(4), 917-924.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., & Weiss, E. I. (2005). Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(3), 247-251.
- Stellato, G., Utter, D. R., Voorhis, A., De Angelis, M., Eren, A. M., & Ercolini, D. (2017). A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. *Frontiers in Microbiology*, 8, 264.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135-138.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964.
- Surette, M. G., & Bassler, B. L. (1998). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7046-7050.

- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, *147*(1), 3-9.
- Szczepanski, S., & Lipski, A. (2014). Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, *36*(1), 224-229.
- Tan, C. H., Oh, H. S., Sheraton, V. M., Mancini, E., Joachim Loo, S. C., Kjelleberg, S., ... & Rice, S. A. (2020). Convection and the extracellular matrix dictate inter-and intra-biofilm quorum sensing communication in environmental systems. *Environmental Science & Technology*, *54*(11), 6730-6740.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Bernal-Mercado, A. T., Gutierrez-Pacheco, M. M., Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., ... & Ayala-Zavala, J. F. (2019). Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: Alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *13*, 531-537.
- Temel, A., & Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, *48*(1), 1-13.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, *220*, 153-161.
- Tyagi, P. K., Mishra, R., Khan, F., Gupta, D., & Gola, D. (2020). Antifungal effects of silver nanoparticles against various plant pathogenic fungi and its safety evaluation on *Drosophila melanogaster*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *10*, 6587-6596.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(4), 1561-1568.
- Vadakkan, K., Choudhury, A. A., Gunasekaran, R., Hemapriya, J., & Vijayanand, S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: pursuit of its cognizance and repression. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 239-252.

- Van, L. T., Hagi, I., Popovici, A., Marinescu, F., Gheorghe, I., Curutiu, C., ... & Lazar, V. (2022). Antimicrobial efficiency of some essential oils in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Plants*, *11*(15), 2003.
- Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H., & McLean, R. J. (2007). Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, *78*(4), 302-310.
- Vuotto, C., Longo, F., & Donelli, G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science*, *6*(4), 189-194.
- Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control*, *91*, 397-403.
- Wang, R. (2019). Biofilms and meat safety: a mini-review. *Journal of Food Protection*, *82*(1), 120-127.
- Wang, X. Y., & Xie, J. (2020). Quorum sensing system-regulated proteins affect the spoilage potential of co-cultured *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from spoiled bigeye tuna (*Thunnus obesus*) as determined by proteomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 940.
- Wang, Y., Hammes, F., Düggelin, M., & Egli, T. (2008). Influence of size, shape, and flexibility on bacterial passage through micropore membrane filters. *Environmental Science & Technology*, *42*(17), 6749-6754.
- Wang, Y., Liu, B., Grenier, D., & Yi, L. (2019). Regulatory mechanisms of the LuxS/AI-2 system and bacterial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(10), 10-1128.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 319-346.
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, *182*(10), 2675-2679.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., & Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(4), 365-404.

- Wickramasinghe, N. N., Ravensdale, J. T., Coorey, R., Dykes, G. A., & Scott Chandry, P. (2019). In situ characterisation of biofilms formed by psychrotrophic meat spoilage *Pseudomonads*. *Biofouling*, *35*(8), 840-855.
- Wingender, J., & Flemming, H. C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *214*(6), 417-423.
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. *Molecules*, *24*(11), 2130.
- Zhang, W., Mi, X., Zhang, C., Cheng, Y., Wang, S., Ji, J., ... & Jiang, Y. (2023). Meat-derived *Escherichia coli* and *Pseudomonas fragi* manage to co-exist in dual-species biofilms by adjusting gene-regulated competitive strength. *Food Microbiology*, *109*, 104122.
- Zhang, Y., Kong, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2018). Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. *Lwt*, *92*, 133-139.
- Zhang, Y., Wei, J., Yuan, Y., & Yue, T. (2019). Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain. *International Journal of Food Microbiology*, *290*, 86-95
- Zhang, Y., Yu, H., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., & Yao, W. (2022). Quorum sensing inhibitory effect of hexanal on Autoinducer-2 (AI-2) and corresponding impacts on biofilm formation and enzyme activity in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* isolated from vegetables. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(2), e16293.
- Zhao, A., Zhu, J., Ye, X., Ge, Y., & Li, J. (2016). Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, *230*, 73-80.
- Zhu, J., Liu, J., Hong, X., & Sun, Y. (2022). Synergism with ϵ -polylysine hydrochloride and cinnamon essential oil against dual-species biofilms of

Listeria monocytogenes and *Pseudomonas lundensis*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 885502.

Zodrow, K. R., Schiffman, J. D., & Elimelech, M. (2012). Biodegradable polymer (PLGA) coatings featuring cinnamaldehyde and carvacrol mitigate biofilm formation. *Langmuir*, 28(39), 13993-13999.



EKLER

EK1: Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Nutrient Agar (NA)

Nutrient agar besiyerinin 20 gramı 1 L distile suda çözündürülmüş ve katı besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm steril petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

b) Nutrient Broth (NB)

Nutrient broth, 8 gramı 1 L distile suda çözündürülmüş ve sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

c) Mueller-Hilton Agar (MHA)

MHA besiyeri, antimikrobiyal testlerde kullanılan besiyeri türüdür. 36 g tartılarak, 1 L'de çözülmüştür. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm steril petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

d) Triptik Soy Broth (TSB)

30 g TSB besiyeri tartılarak 1 L distile suda çözülmüş ve otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

e) %1 Kristal Viyole (CV)

%1'lik kristal viyole boyasından 1 gram tartılarak 100 ml distile suda çözündürülmüştür.

f) %33 Asetik asit

67 mL saf suyun üzerine 33 ml, %99,9'luk asetik asitten yavaş yavaş ilave edilmiştir.

g) Marine Agar (MA)

Marine Agar, Marine Broth'a %1,5 agar (w/v) eklenerek hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm steril petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

h) LB Broth

LB (Luria-Bertani) broth, 25 gramı 1 L distile suda çözündürülmüş ve sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

i) LB Agar

LB (Luria-Bertani) agar, 32 gramı 1 L distile suda çözündürülmüş ve katı besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm steril petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

j) AB Besiyeri

AB besiyeri (Autoinducer bioassay, otoindüktör biyoanaliz besiyeri) Bassler, Wright ve Silverman (1994)'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. 0,3 M NaCl, 0,05 M MgSO₄, %0,2 casamino asitten (Difco) oluşan besiyeri ortamı KOH ile pH 7,5 ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra soğuyan besiyerine litre başına, 10 mL 1M potasyum fosfat (pH 7.0), 10 mL 0,1M L-arginine, 10 ml gliserol steril olarak ilave edilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Beyza Nur GÜÇ

A. EĞİTİM

Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2022, İstanbul

Yüksek Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim dalı Gıda Mühendisliği Bölümü, 2024, İstanbul

B. MESLEKİ DENEYİM

Temmuz 2021 - Ağustos 2021: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Arslan Nano Industries, Stajyer

C. PROJELERİ

- 1- “Laktik Asit Fermentasyonu ile Üretilen Meyve Ürünleri”, Lisans Tezi, 2022
- 2- 1220439 No’lu “*Pseudomonas Fragi*’nin Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing) Sistemi ve Bunun Etin Bozulması ile İlişkisinin Araştırılması”, 2022, Tübitak Projesi Bursiyeri

D. SERTİFİKALAR

- 1- 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetimi (İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, 2021)
- 2- 22000 Gıda Güvenliği Yönetimi (İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, 2021)
- 3- 9001 Kalite Yönetimi (İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, 2021)
- 4- Temel Hijyen Eğitimi (İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, 2021)

E. BİLDİRİLER

1- International Food Innovation And Sustainability Congress

Effect of Thyme Essential Oil on Biofilm and Motility in Meat *Pseudomonas*

[İstanbul, Türkiye (Poster Sunumu), 16/05/2024 – 18/05/2024]

Güç B. N., Küçükata Y. Ş., Metin B.

