

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RUTENYUM KOMPLEKSİNİN ANTİBİYOFİLM
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLSEREN ÇETİNKAYA

DENİZLİ, ARALIK - 2024

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**RUTENYUM KOMPLEKSİNİN ANTİBİYOFİLM
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLSEREN ÇETİNKAYA

DENİZLİ, ARALIK - 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

GÜLSEREN ÇETİNKAYA

ÖZET

**RUTENYUM KOMPLEKSİNİN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GÜLSEREN ÇETİNKAYA
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)**

DENİZLİ, ARALIK - 2024

Sunulan yüksek lisans tez çalışmasında, antibiyofilm aktivite uygulamasını hedefleyen bipiridin ligandı içeren rutenyum kompleksi (Ru(4,4'-dikarboksi-2,2'-bipiridin)(4,4'-bis(3-etilheptil)-2,2'bipiridin(NCS)2) kullanılmıştır. RuCS27'nin biyofilm inhibisyonu ve biyofilm parçalama performansı, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909, *Bacillus cereus* ATCC 10976 ve *Enterococcus hirae* ATCC 10541'e karşı XTT indirgeme yöntemi ile *in vitro* olarak test edilmiştir. 40 µM RuCS27, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve *E. faecalis* biyofilm gelişimini sırasıyla %63,27 %92,59, %82,68 ve %95,44 oranında inhibe ederken, *L. innocua* ve *B. cereus* biyofilminin %43,71 ve %43,15'i 65 µM RuCS27 varlığında inhibe olmuştur. Buna karşılık *E. hirae* ve *S. parasanguinis* biyofilmine karşı herhangi bir inhibisyon etki gözlenmemiştir. RuCS27'nin tespit edilen güçlü biyofilmi parçalama aktivitesinde biyofilm yaşından daha çok rutenyuma maruz kalma süresi daha önemli olmuştur. Bakterilerin biyofilm yapıları propidyum iyodür ve DAPI ile boyanarak floresan mikroskop altında incelenmiştir. Her iki boyamada da bakterilerin kontrole kıyasla RuCS27 ile muamele sonrasında biyofilm yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür. RuCS27'nin çalışmada kullanılan patojenlerin biyofilm oluşumunu engellediği ve önceden var olan biyofilmin yoğunluğunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, RuCS27 bakteri biyofilmlerini önlemek ve ortadan kaldırmak için antibiyofilm ajanı olarak iyi bir seçenek olabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Antibiyofilm, biyofilmi parçalama etkisi, floresan mikroskop, rutenyum

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIBIOFILM ACTIVITY OF RUTHENIUM COMPLEX

MSC THESIS

GÜLSEREN ÇETİNKAYA

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, DECEMBER 2024

In this study, the ruthenium complex containing bipyridine ligand (Ru(4,4'-dicarboxy-2,2'-bipyridine)(4,4'-bis(3-ethylheptyl)-2,2'-bipyridine)(NCS)₂) was used targeting antibiofilm activity. The biofilm inhibition and disruption performance of RuCS27 was tested *in vitro* via the XTT reduction method against *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909, *Bacillus cereus* ATCC 10976, and *Enterococcus hirae* ATCC 10541. 40 µM RuCS27 inhibited biofilm formation of *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, and *E. faecalis* by 63.27%, 92.59%, 82.68%, and 95.44%, respectively, while 65 µM RuCS27 inhibited 43.71% of *L. innocua* and 43.15% of *B. cereus* biofilm formation. In contrast, no inhibition effect was observed against the biofilms of *E. hirae* and *S. parasanguinis*. In the biofilm disruption activity of RuCS27, the exposure time to ruthenium was found to be more important than the biofilm age. Bacterial biofilm structures were stained with propidium iodide and DAPI and examined under a fluorescence microscope. In both stains, a reduction in biofilm density was observed in bacteria treated with RuCS27 compared to the control. It was concluded that RuCS27 inhibited biofilm formation of the pathogens and reduced the density of pre-existing biofilms. According to these results, RuCS27 could be a promising antibiofilm agent to prevent and eliminate bacterial biofilms.

KEYWORDS: Antibiofilm, biofilm degradation effect, fluorescence microscope, ruthenium

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1 Biyofilm.....	3
2.2 Metal Bazlı Bileşikler.....	7
2.3 Rutenyum Bazlı Bileşiklerin Uygulama Alanları	8
2.4 Rutenyumun Biyolojik Özellikleri	8
2.5 Tezin Amacı	12
3. YÖNTEM.....	13
3.1 Materyal.....	13
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri, Kimyasal Maddeler ve Kitler	13
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	13
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	14
3.1.4 RuCS27 ve Test Bakterileri	15
3.2 Metot	16
3.2.1 Rutenyum CS27'nin Biyofilm İnhibisyon Etkisi.....	16
3.2.2 Rutenyum CS27'nin Oluşmuş Biyofilmi Parçalama Etkisi.....	17
3.2.3 Floresan Mikroskop Analizi	17
3.2.4 İstatiksel Analiz	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1 Rutenyum CS27'nin Antibiyofilm ve Metabolik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	19
4.2 Rutenyum CS27'nin Oluşmuş Biyofilmi Parçalama Etkisi	29
4.3 Mikroskop Analizi.....	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
6. KAYNAKLAR.....	38
7. ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Biyofilm oluşumu	4
Şekil 2.2: Antibiyofilm stratejisi	5
Şekil 2.3: Antibiyofilm stratejisi.	6
Şekil 3.1: Rutenyum CS27'nin moleküler yapısı.	15
Şekil 4.1: RuCS27'nin bakteriyel biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi	25
Şekil 4.2: RuCS27'nin oluşmuş biyofilmi parçalama aktivitesi.....	32
Şekil 4.3: Propidyum iyodür (PI) boyaması ile elde edilen Floresan mikroskop görüntüleri.	35
Şekil 4.4: DAPI-CTC boyaması ile elde edilen <i>E. coli</i> ATCC 8739 biyofilminin floresan mikroskop görüntüleri	36

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1: RuCS27'nin antibiyofilm aktivitesi.....	21
Tablo 4.2: RuCS27'nin metabolik aktivitesi.....	22
Tablo 4.3: RuCS27'nin oluşmuş biyofilmi parçalama aktivitesi	30



SEMBOL LİSTESİ

Ru: Rutenyum

RuCS27: Ru(4,4'-dicarboxy-2,2'-bipyridine)(4,4'-bis(3-ethylheptyl)-2,2'-bipyridine)(NCS)₂

EPS: Ekzopolisakkarit

CO-ADD: Açık Antimikrobiyal İlaç Keşfi Topluluğu

DOGP: 1,2-dioleoilfosfatidilgliserol

MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyon

MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon

TSA: Tryptic soy agar

TSB: Tryptic soy broth

LB: Luria Bertani-Miller Broth

THB: Todd-Hewitt Broth Besiyeri

DMSO: Dimetil sülfoksit

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PI: Propidyum iyodür

CTC: 5-Siyano-2,3-bis(4-metilfenil)-2 H -tetrazolyum klorür

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorür

XTT: Hücre Proliferasyon Kiti (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid)

ATCC: Amerika tipi kültür koleksiyonu

NCTC: Ulusal Tip Kültürleri Koleksiyonu

dH₂O : Distile su

M: Molaritre

g: Gram

mM: Milimolar

µM: Mikromolar

µl: Mikrolitre

mg/mL: Miligram / Mililitre

g/L: Gram/ Litre

$\mu\text{g/ml}$: Mikrogram/ Mililitre

OD: Optik Dansite

nm: Nanometre

CFU: Koloni oluşturan birim

SeNP: Selenyum nanopartikülleri

PDI: Fotodinamik inaktivasyon

Ag: Gümüş

NP: Nanopartikül

rpm: Dakikadaki devir sayısı



ÖNSÖZ

Üniversite hayatımın ilk gününden bu yana lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca, maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, değerli danışmanım Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Tez çalışmamda kullandığım Rutenyum bileşimini sentezleyen Prof.Dr. Çiğdem ŞAHİN'e,

Çalışmalarım süresince bana yol gösterip yardımcı olan, bilgilerini her zaman benimle paylaşan değerli hocam Dr. Naime Nur BOZBEYOĞLU KART'a,

Lisans eğitimimden bu yana birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, desteğini hep hiç esirgemeyen Volkan KUZUCU'ya,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hep hissettiğim beni özenle yetiştiren çok kıymetli annem Eray İLHAN'a,

En büyük destekçim, hep yanımda olan sevgili eşim Yasin ÇETİNKAYA'ya sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar serbest formda ya da biyofilm adı verilen farklı veya aynı türlerin oluşturduğu topluluklar halinde yaşayabilirler. Karmaşık mikroorganizma toplulukları olan biyofilmler, içlerine gömülü bakterileri stres, deterjan, antibiyotik ve UV ışınları gibi fiziksel ve kimyasal etkilerden koruduğu gibi patojen mikroorganizmaları immün sistem savunmasına karşı dirençli hale getirir (Bennett ve diğ. 2023). Biyofilm içinde bulunan mikroorganizmaların birbiriyle yakın iletişimi ve alışverişi sonunda yüksek düzeyde antibiyotik direnci gelişir. Bu nedenle biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar tipik olarak kronik seyreder. Uzmanlara göre, enfeksiyonların yaklaşık %80 gibi büyük bir kısmını biyofilmler oluşturur (Ausbacher ve diğ. 2023). Biyofilm sadece bir patojenik bakteri kaynağı değildir; aynı zamanda enfeksiyonel hastalıkların seyrinde konakçıda iltihaplanmaya neden olmasıyla bağışıklık sisteminde aktif bir rol oynayarak zayıflamalara da yol açar (Vestby ve diğ. 2020). Bağışıklık sisteminin zayıflaması sonucu biyofilm yapısı, sık tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları, çocuklarda görülen orta kulak enfeksiyonları, diş plakları ve diş eti iltihabı, kateter enfeksiyonları gibi sık görülen enfeksiyonlara sebep olur (Lewis 2001).

Halk sağlığı, patojen mikroorganizmalar arasında yayılan antimikrobiyal direnç nedeniyle küresel olarak büyük tehdit altındadır. Özellikle *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi bakteriler antimikrobiyal direnç kazanan en yaygın bakteriler arasındadır. Bu tür patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilm, önemli bir virülans faktörüdür. Dolayısıyla kronik enfeksiyonların bir parçası haline gelen biyofilm ile mücadelede etkili yeni ürünlerin bulunması veya tanınması önemlidir.

Günümüzde mikrobiyal dirence bir alternatif olarak geçiş metali kompleksleri arasında bulunan Rutenyum kompleksleri, diğer platin grubu metal bileşiklere kıyasla düşük toksisite, antitümör ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle klinikte umut vaat etmektedir. Günümüzde antibiyotik dışı tedavi yöntemi geliştirilmek amacıyla birçok rutenyum kompleksinin etkinliği araştırılmaktadır.

Bu alışmada, Prof. Dr. Çiğdem şAHİN ve arkadaşları tarafından sentezlenen Rutenyum CS27 (Ru(4,4'-dikarboksi-2,2'-bipiridin)(4,4'-bis(3-etilheptil)-2,2'bipiridin(NCS)2) kompleksinin (Sahin ve diğ. 2010) farklı patojenlere karşı biyofilm inhibisyon etkisi ve biyofilmi parçalama antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada, Rutenyumun antibiyofilm aktivitesi DAPI-CTC boyaması ile de doğrulanmıştır.



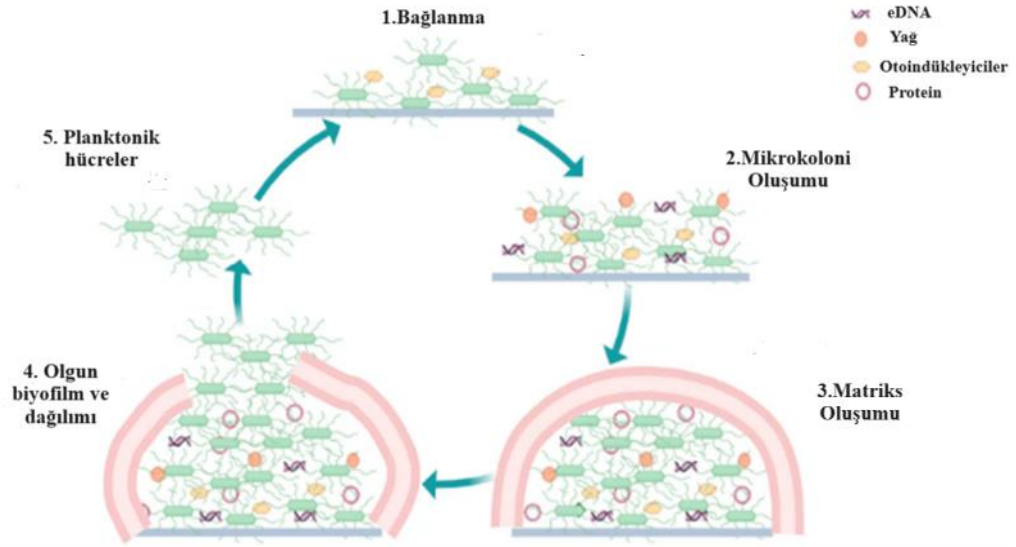
2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 Biyofilm

Mikroorganizmalar, biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunarak katı yüzeylerde kendiliğinden protein, DNA ve lipit gibi ekzopolisakkarit (EPS) matriksler sentezleyerek etraflarını saran biyofilm adı verilen koruyucu bir yapı oluştururlar (Coughlan ve diğ. 2016). Canlı dokular, implantlar, su kanalları, su boruları, dereler, gıda işleme üniteleri gibi birçok yerde oluşabilen bu biyofilm tabakası sayesinde mikroorganizmalar çevresel toleranslarını artırarak stres koşullarına karşı dayanıklılık kazanırlar (Song ve diğ. 2023).

Planktonik bakteri hücreleri, uygun koşullar altında bir yüzeye kendisini bağlayarak biyofilm sürecinin ilk aşamasını başlatır. Mikroorganizmaların yüzeylere başarılı bir şekilde yapışmasından kısa bir süre sonra, bu yapışan mikroorganizmalar, ürettikleri EPS içerisinde çoğalmaya ve toplanmaya başlarlar. Daha sonra birçok hücre, su kanalları ile birlikte mikro koloniler oluştururlar. Koloni içindeki sayısız mikroorganizma, hücreleri sabitlemek için yoğun olarak EPS salgılar ve bir EPS matriksi oluşturur.

Uygun koşulların ve besin maddelerinin varlığında gelişen bu koloniler, uzaysal bir mimariye sahip olgun biyofilm yapı oluşturmak üzere farklılaşır. Olgunlaşan biyofilm, yeni yüzeylere seyahat etme kapasitesine sahip bireysel planktonik hücreleri zaman içinde serbest bırakarak bakteri istilasının yayılmasına da yol açar. Biyofilm oluşum aşaması Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Rather ve diğ. 2021, Nadar ve diğ. 2022). Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar, çoklu direnç mekanizmaları sayesinde bilinen birçok antibiyotiğe direnç geliştirirler (Donlan ve Costerton 2002). Bu yapı, bakteriler için koruyucu kalkan görevi görerek antimikrobiyal ajanlardan ve konakçının bağışıklık sistemi elemanlarından bakteriyi koruyarak direnç kazanmasını sağlar ve tedaviyi zorlaştırır (Hussaini ve diğ. 2023). Biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bu tür mikroorganizmalar, ilk defa karşılaştıkları antimikrobiyal bileşiklere karşı bile çok çabuk direnç geliştirebilirler (Tsiodras ve diğ. 2001, Bolhuis ve diğ. 2011).



Şekil 2.1: Biyofilm oluşumu (Nadar ve diğ. 2022)

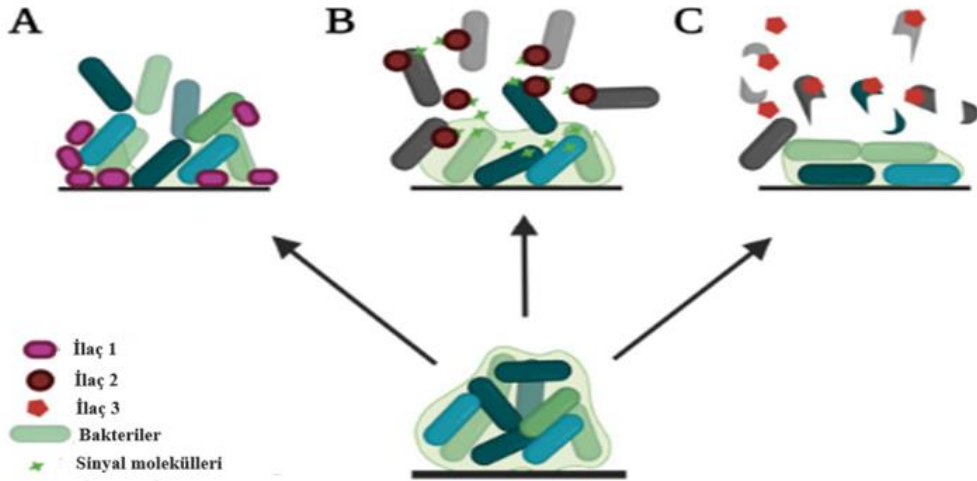
Aynı bakterinin biyofilm yapısı ile planktonik formu kıyaslandığında ortaya çıkan antibiyotik direnci birbirinden farklıdır (Hassan ve diğ. 2023). Diğer bir deyişle, antimikrobiyal ajanlara, konakçının immün sistemine, stres gibi çevresel koşullara karşı biyofilm yapısının içinde bulunan bakteriler serbest olarak bulunan planktonik hücrelere kıyasla daha dirençlidirler (Crabbé ve diğ. 2019, Gao ve diğ. 2023). Dayanıklılık ve direnç mekanizması bakteriden bakteriye farklılık gösterse de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Actinobacter* gibi gram negatif patojenler, dış zarlarının geçirgenliğinin az olması ve porların seçici-geçirgen hücre yapısına sahip olmasıyla doğası gereği zaten dirençli yapıdadırlar (Munteanu ve diğ. 2021). Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar metabolik faaliyetlerini olabildiğince minimuma indirdikleri için planktonik hücrelere göre daha yavaş büyürler ve ortamdaki antimikrobiyal ajanları da hücre içerisine daha yavaş alırlar (Donlan ve Costerton 2002).

Patojenlerle mücadele uygulanan agresif ve yoğun antibiyotik tedavisi, genellikle dağınık bakterilerin neden olduğu kronik biyofilm enfeksiyonlarının alevlenmesini önlemeye ve biyofilmleri azaltmaya yardımcı olur ancak bu uygulama biyofilm enfeksiyonlarını ortadan kaldıramaz çünkü olgun biyofilmin yok edilmesi

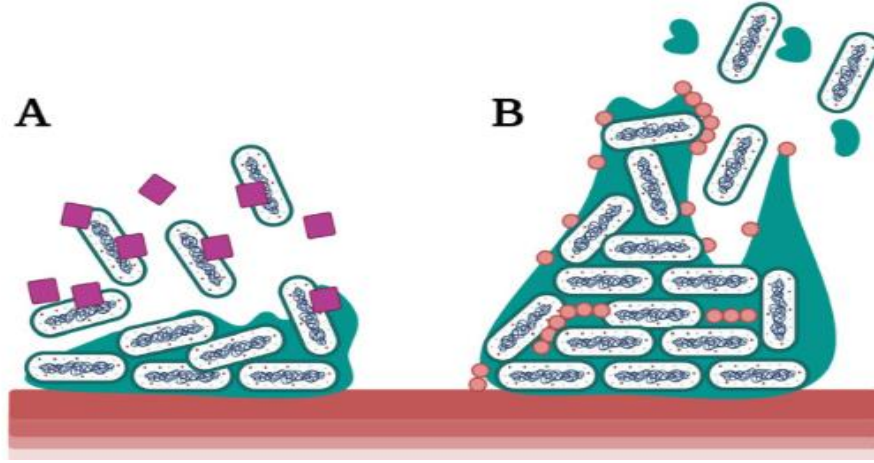
için minimum antibiyotik konsantrasyonuna in vivo olarak ulaşmak oldukça zordur (Høiby ve diğ. 2010, Hengzhuang ve diğ. 2011, Høiby 2011).

Bakteriyel biyofilm oluşumu, suyun bulunduğu doğal ortamlardan implant, kateter gibi tıbbi cihazlarla ilişkili hastalara kadar çok farklı çevrelerde yaygındır. Tıp bilimindeki ilerlemeyle birlikte insan hastalıklarının tedavisinde tıbbi cihazlar ve yapay organların giderek daha fazla kullanılmasına bağlı olarak bakteriyel biyofilm enfeksiyonları da sıklaşmıştır. Hepsi değilse de büyük çoğunluğunun biyofilm enfeksiyonlarına yol açabileceği bildirilmiştir (Hall-Stoodley ve diğ. 2004).

Biyofilm üretimi ile oluşan enfeksiyonlarda, biyofilm yapılar enfeksiyon bölgesine bir kez yerleştiğinde oradan uzaklaştırılması zorlaşır. Çünkü biyofilmlerin karmaşık yapısı, biyofilm içindeki patojenleri antimikrobiyal maddelerin bilinen tüm etki mekanizmalarından koruyabilmektedir. Antibiyofilm ajanlar çoğunlukla, bakteri üremesini inhibe ederek, bakterilerin buldukları yüzeylere yapışmasını engelleyerek veya hücre iletişimini bozarak etki göstermektedir (Şekil 2.2). Antibiyofilm ajanlar, oluşmuş biyofilmleri de ortadan kaldırabilir ve hatta EPS'yi bozarak bakteriyel hücrelerin biyofilm matriksinden uzaklaştırılmasını da kolaylaştırabilirler (Şekil 2.3) (Bi ve diğ. 2021, de Almeida Campos ve diğ. 2023).



Şekil 2.2: Antibiyofilm stratejisi A: bakteriyel yapışmanın engellenmesi, B: hücre iletişiminin bozulması, C: bakterilerin ortadan kaldırılması (de Almeida Campos ve diğ. 2023)



Şekil 2.3: Antibiyofilm stratejisi A: Biyofilmlerin yok edilmesine yönelik stratejiler, B: Bakteri hücrelerinin biyofilm matriksinden uzaklaştırılması (de Almeida Campos ve diğ. 2023).

Biyofilmlerin, sağlık dışında endüstriyel uygulamalarda da önemli bir yeri vardır. Örneğin, azot bakımından zengin tarım ve sanayi kaynaklı atık su arıtımında, bakterilerin kirletici maddeleri uzaklaştırma yeteneği, aktif çamur prosesi ve biyofilm biyoreaktörleri aracılığıyla kullanılmaktadır (Mai ve diğ. 2021). Benzer şekilde, aşırı fosfat da su kütlelerinde gereksiz büyümeyi teşvik ederek tıkanmalara yol açar. Biyofilm oluşturabilen fosfat biriktiren *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus vacuolatus* ve *Scenedesmus obliquus*'tan oluşan mikroalgal biyofilmlerin bu büyümenin ortadan kaldırılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir (Akao ve diğ. 2021) Biyofilmler, esas olarak çevre dostu, düşük maliyetli ve yeşil teknoloji sağlamaları nedeniyle organik kirleticilerin parçalanmasında da etkilidirler. *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, *Cyclocasticus*, *Bacillus* ve *Rhodococcus* biyofilmlerinin yüzeyindeki aktif fonksiyonel grupların, petrolle kirlenmiş denizlerdeki hidrokarbonları temizleme yeteneğine sahip oldukları ve bakteriyel biyofilmlerin ham petrol sızıntılarını kolaylıkla temizleyebildiği rapor edilmiştir (Sonawane ve diğ. 2022).

2.2 Metal Bazlı Bileşikler

1978 yılında Barnett Rosenberg'in sisplatinin biyolojik aktivitesi ile ilgili keşfi, tıpta biyoorganik kimyaya karşı ilgiyi metal kompleksler sayesinde toplamıştır (Ghosh 2019, Scalese ve diğ. 2022). Metal bazlı komplekslerin boyutları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, onların endüstri, tıp, sanayi ve tarım gibi birçok alanda tercih edilmesine yol açmıştır (Khan ve diğ. 2021).

Giderek artan antibiyotik direnci küresel bir tehdit oluşturarak en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Bu nedenle, bu sorunu çözmek için yeni bileşiklerin bulunmasına acil ihtiyaç duyulmuştur. Yapılan çalışmalarda var olan antibakteriyel ilaçların organometalik olarak üretilmeye başlamasıyla metal bazlı ajanlar patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal olarak kullanılmaya başlanmıştır (Biegański ve diğ. 2021). Tek başına veya bilinen antibiyotiklerle birlikte kombine kullanımı üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar, dikkati metal bazlı bileşiklere yönlendirmiştir (Evans ve diğ. 2021).

Açık Antimikrobiyal İlaç Keşfi Topluluğu (CO-ADD)'ndaki verilere göre, metal bazlı bileşiklerin ESKAPE adı verilen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.* patojen ve mantarlara karşı göz ardı edilemeyecek ölçüde antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği anlaşılmıştır (Frei ve diğ. 2020).

Hastalıklara göre tedavilerde farklı metaller tercih edilmiştir; örneğin romatoid artrit hastalığının tedavisinde altın, auranofin ve miyokrisin gibi metaller kullanılırken bakteri veya mantar kaynaklı hastalıklarda ise gümüş ve gümüşün kompleksleri kullanılmaktadır (Sharma ve diğ. 2022). Demir, güçlü antimikrobiyal bir molekül olduğu için tüberküloz tedavisinde demir-kinoksalin kullanılmaktadır (Khan ve diğ. 2007, Tarallo ve diğ. 2010, Sharma ve diğ. 2022).

Kanser tedavisinde metal komplekslerin özellikle tercih edilmesindeki ana sebepler metallerin değişken koordinasyon yapıları, sahip oldukları redoks aktivitesi ve organik substrata karşı reaktivite vermesidir. Bu özellikler sayesinde direk biyomoleküler hedefe bağlanır ve o hedefte çoğalma mekanizmasında değişikliklere sebep olur (Lucaciu ve diğ. 2022). Aynı zamanda yüksek seçicilik, düşük toksisite ve kanserli doku tarafından kolayca emilim ve atılım özelliklerine sahip olması rutenyum (Ru) gibi metal ilaçları kanser tedavilerinde eşsiz kılar (Benjamin ve diğ. 2011).

2.3 Rutenyum Bazlı Bileşiklerin Uygulama Alanları

Merkez metale bağlı organik ligandlardan oluşan geçiş metali kompleksleri arasında yer alan rutenyum kompleksleri halk sağlığı ile ilgili uygulamalarda önemli bir rol almıştır (Ma ve diğ. 2013, Medici ve diğ. 2015, Lee ve diğ. 2020), ve rutenyum kompleksleri birçok açıdan bilim insanlarının ilgisini çekmektedir (Levina ve diğ. 2009, Dragutan ve diğ. 2015, Lee ve diğ. 2020). Geçiş metali serisinin ikinci sırasının merkezinde yer alan rutenyum hem erken hem de geç geçiş metali özelliklerini gösterir (Grubbs 2003, Lee ve diğ. 2020). Rutenyum, diğer metaller arasında eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir, bu da onun farmakolojide tercih edilebilirliğini arttırmıştır (Allardyce ve diğ. 2001; D'Amato ve diğ. 2023). Seçici antimetastatik ve düşük sistemik toksisiteye sahip olmasıyla hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda rutenyum kompleksleri, mükemmel antitümör aktivite sergilemektedirler (D'Amato ve diğ. 2023).

2.4 Rutenyumun Biyolojik Özellikleri

Antibiyotiklerin ortaya çıkmasıyla enfeksiyonel hastalıklara çözüm bulunduğu düşünülmüştü (Reygaert 2018). Ancak bakterilerin antibiyotiklere karşı giderek direnç kazanmaya başlaması hastalıkların tedavisini zorlaştırarak küresel bir sağlık sorunu haline almaya başladı (Jabłońska-Wawrzycka ve diğ. 2021). Oluşan bu antimikrobiyal direnç, halk sağlığının en önemli sorunu haline gelmiştir. Var olan antibiyotiklerin çoğu bakterilerin daha da direnç kazanmasına sebep oldukları için antibiyotiklerin yerine geçebilecek yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesi gerekmektedir (ChunYan ve diğ. 2022).

Rutenyum kompleksleri stabil ve inert bileşiklerdir (Southam ve diğ. 2017, Munteanu ve diğ. 2021). Komplekslerin antibakteriyel özellikleri lipofilik özelliklerine ve iyon yüklerine bağlıdır; rutenyumun bulunduğu ortamdaki pozitif yükler artışa geçer ve bakterilerin negatif yüklü hücre duvarlarını hedef alırlar (Munteanu ve diğ. 2021). Yüksek termodinamik/kinetik stabiliteleri, DNA, RNA ve proteinlerle etkileşime girebilme özelliği ve çözünürlüğünün yüksek olması rutenyumları tercih edilebilir kılar (Conti ve diğ. 2021). Sisplatin gibi metal bazlı komplekslerle ilgili daha önce yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir

ancak aşırı sitotoksosite ve yüksek oranda görülen yan etkileri sonucunda başka metal kompleks arayışına girilmiş ve rutenyumun anti-bakteriyel ve anti-kanser özelliklerinin keşfedilmesiyle rutenyum kompleksleri ve türevlerine ilgi artmıştır (Yang ve diğ. 2018).

Genellikle rutenyum bazlı ilaçların üretiminde fosfin, siklopentadienil türevleri ve amin gibi ligandlarla kompleks oluşturulur. Birçok ligandla kompleks oluşturulabilmesi sayesinde farklı etkiler gözlemlenebilmektedir. Örneğin aren ile oluşturulan komplekslerde gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı iyi antimikrobiyal aktivite gösterirken (Nolan ve diğ. 2022, Huang ve diğ. 2023), dipiridofenazin ile kompleks oluşturan rutenyum, gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri kolaylıkla öldürebilmektedir (Bolhuis ve diğ. 2011, Huang ve diğ. 2023).

Bu bileşiklerin biyoloji ve tıbbi alanlardaki en önemli tercih edilme sebepleri diğer metal bazlı komplekslere kıyasla hedeflenmiş doku dışındaki diğer dokulara karşı hemen hemen hiç toksik etki göstermemesidir (Singh ve diğ. 2021). Rutenyumun antimikrobiyal aktivitesini incelemek için yapılan bir çalışmada yüksek çözünürlük ve düşük toksisite özelliklerine sahip $[Ru(CO)_2Cl_2]$ sentezlenmiş ve UV-A ışınımında patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstererek bakteriyel enfeksiyon tedavilerinde umut vaat ettiği ifade edilmiştir (Ghosh ve diğ. 2021). Bilindiği üzere antimikrobiyal peptitler biyofilm inhibisyonunda etkilidirler. Rutenyum ve antimikrobiyal peptitlerin benzer özellikleri nedeniyle antibiyofilm etkili olabileceği düşünülerek yapılan bir çalışma ile *Staphylococcus aureus*'un oluşturduğu biyofilmin gelişmesini Ru(II)-I'in engellediği görülmüştür (Wang ve diğ. 2022).

Ru (II) ve Ru (III) kompleksleri, oktehadral yapısı, hedefler için seçici olması ve üç boyutlu yapısı nedeniyle çeşitli biyolojik ve biyomedikal özelliklere sahiptir (Brabec ve diğ. 2018). Özellikle zengin koordinasyon kimyaları (Oner ve diğ. 2012), protein ve nükleik asitlere bağlanma kapasiteleri nedeniyle bilim camiasında ilgi çekici kompleksler olmuşlardır. Tan ve diğerleri (2008), yaptıkları çalışmada $mer-[RuCl_3(CH_3CN)(dpq)]$ 'nin (1) ve $mer-[RuCl_3(DMSO)(dpq)]$ 'nin (2) olmak üzere iki farklı rutenyum kompleksinin DNA ve proteine bağlanma kapasitesini karşılaştırdıklarında birinci kompleksin DNA ve proteine karşı daha yüksek bağlanma afinitesi olduğunu analiz etmişlerdir.

Patojen bakterilere karşı yeni antibiyofilm bileşikler arasında belki de en umut verici maddelerden biridir (Andrade ve diğ. 2020, Sahin ve diğ. 2021, Kilincarslan ve

diğ. 2022). Rutenyum komplekslerinin kolayca sentezlenebilir olması, farklı fizyolojik koşullara karşı stabil olması ve özellikle diğer metal bazlı komplekslerde görülen sitotoksik etkinin olmaması rutenyumun tercih edilebilirliğini arttırmıştır (Bolhuis ve diğ. 2011). Diğer metal komplekslerle kıyaslandığında anti-kanser aktivitesindeki potansiyel de rutenyum komplekslerine karşı büyük ilgi doğurmuştur (Aird ve diğ. 2002, Kumarasamy ve diğ. 2023).

Appelt ve diğerleri (2015), sentezledikleri ($[\text{Ru}(\text{mctz})_2(\text{PPh}_3)_2]$ ve $[\text{Ru}(\text{mcbtz})_2(\text{PPh}_3)_2]$) rutenyum bazlı komplekslerin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı nispeten yüksek bir antibakteriyel aktivite gösterirken insan hücrelerine karşı düşük toksisite veya toksik olmayan bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{mctz})_2(\text{PPh}_3)_2]$ ve $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{mcbtz})_2(\text{PPh}_3)_2]$ komplekslerin prokaryotik hücrelere karşı spesifik etkisi olduğunu ve geleneksel antibiyotiklere dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için iyi adaylar olacağını ileri sürmüşlerdir. Jabłońska-Wawrzycka ve diğerleri (2021), ligandları birbirinden farklı 3 rutenyum kompleksinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* LES B58 (klinik) suşlarına etkisini incelemişler ve rutenyum komplekslerinin suşlar arasında farklı aktivite gösterdiği sonucuna varmışlardır. Test edilen tüm suşlara karşılık en etkili olan bileşik Ru (III) kompleksi olmuştur. *Pseudomonas* suşunun direncini incelediklerinde Ru (III) kompleksinin düşük konsantrasyonları bile kontrole kıyasla hücre büyümesini azaltmıştır. Liu ve diğerleri (2018), yaptıkları çalışmada yeni mononükleer dppz bazlı $[\text{Ru}(\text{bb}_7)(\text{dppz})]^{2+}$ kompleksi sentezlemişlerdir. Bu kompleksin ana kompleksi olan $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, Gram pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösterirken gram negatif bakterilere karşı $[\text{Ru}(\text{bb}_7)(\text{dppz})]^{2+}$ daha yüksek aktivite göstermiştir. 1,2-dioleoilfosfatidilgliserol (DOGP) lipozomlarıyla yapılan analizler, $[\text{Ru}(\text{bb}_7)(\text{dppz})]^{2+}$ 'nin membranlarla $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 'ya göre daha güçlü etkileşime girdiğini, bunun da membranları katyonik metal komplekslerine karşı daha geçirgen hale getirebildiğini ortaya koymuştur. Örneğin, Andrade ve diğerleri (2020), rutenyum kompleksi $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bqdi})]^{2+}$ (RuNN)'nin antibakteriyel aktivitesini, antibiyotikle ilişkili sinerjisini ve anti-biyofilm aktivitesini araştırmışlardır. Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite sergileyen RuNN kompleksi, hem *Staphylococcus aureus* biyofilm oluşumunu engellemiş hem de olgun biyofilmi bozmuştur. Bolhuis ve diğerleri (2011), DNA'yı bağlayabilen mononükleer polipridilrutenyum (II) komplekslerinin, bazı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) da dahil

olmak üzere *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı önemli bakterisidal aktivite sergilediğini bildirmiş ve bazı komplekslerin Gram pozitif suşlara karşı düşük minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sergilediğini rapor etmiştir. Lam ve diğerleri (2014), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı iyi aktivite gösteren bir N-fenil ikameli diazafloren ligandı içeren bir bis(2,2'-bipiridin) rutenyum (II) kompleksini rapor etmiştir. Devi ve diğerleri (2013), ayrıca dppz ligandı veya 2-feni-imidazo-1,10-fenantrolin ligandlarının türevlerini içeren bir dizi mononükleer rutenyum kompleksinin orta düzeyde aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Benzer bir başka çalışmada farklı bipiridin ligandı içeren 3 rutenyum kompleksinin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 biyofilmi üzerine etkisi incelenmiş ve RuL3'ün hem biyofilm inhibisyon etkisi hem de biyofilmi parçalama etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Kilincarslan ve diğ. 2022). Farklı rutenyum komplekslerinin *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı da seçici antibiyofilm aktiviteleri rapor edilmiştir (Czerwonka ve diğ. 2019; Rogala ve diğ. 2019). Bu ve diğerleri (2020), sentezledikleri rutenyum kompleksinin *Staphylococcus aureus* biyofilmini inhibe ettiğini ve bakterinin rutenyum kompleksine direnç geliştiremediğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, rutenyum kompleksinin bakterinin antibiyotiklere duyarlılığını artırıp artıramayacağını test etmişler ve Ru (II)-1 ile *Staphylococcus aureus*'un bazı aminoglikozid antibiyotiklere (kanamisin ve gentamisin) duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir. Üstelik çalışmada murin deri enfeksiyonu modeli ile in vivo bakteriyel enfeksiyon tedavisinde rutenyum komplekslerinin iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu doğrulanmıştır. Sales ve diğerleri (2021), iki indazol ligandı içeren metal kompleksi, *cis*-[Ru(Hind)₂(bpy)₂]²⁺ (FOR0D2), sentezlemişler ve yaptıkları çalışmalarda in vitro kanser hücre hatlarında, özellikle karaciğer kanseri hücrelerine (HepG2) karşı olumlu sonuçlar almışlardır. HepG2 hücrelerinde hücre döngüsünün S fazında apoptotik hücre ölümlerine neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu maddenin sağlıklı insan hücrelerine de sitotoksik etkisi görülmemiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde rutenyum kompleksinin anti-kanser etkisinin olduğu görülmüştür. Kaushal ve diğerleri (2024), [Ru(L¹)₃] (1), [Ru(L²)₃] (2), [Ru(L³)₃] (3), [Ru(L⁴)₃] (3) ve [Ru(HL⁵)₃Cl₃] (5) olmak üzere beş tane rutenyum (III) kompleksi sentezlemişler ve on farklı patojenik bakteri üzerinde antibakteriyel aktivitesini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda sentezledikleri rutenyum (III) komplekslerinin *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Alcaligenes faecalis*'e karşı daha güçlü

olduđu anlařılmıřtır. Zon inhibisyon çapları incelendiđinde kompleks $[Ru(L^1)_3]$ (1), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karřı, kompleks $[Ru(L^2)_3]$ (2) *Staphylococcus epidermidis*, *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karřı, kompleks $[Ru(L^3)_3]$ (3) *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Micrococcus luteus*'a karřı, kompleks $[Ru(L^4)_3]$ (4) *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karřı, kompleks $[Ru(HL^5)_3Cl_3]$ (5) *Aeromonas hydrophila* ve *Salmonella typhimurium* daha aktiftir. Ligandlar ve rutenyumun kompleksleri arasındaki iliřki deđerlendirildiđinde bazı komplekslerin ligand varlıđında antibakteriyel aktiviteyi arttırırken bazı komplekslerin de antibakteriyel aktiviteyi dűřürdűđü gűrűlműřtűr. de Sousa ve diđerleri (2020), rutenyumun antimikrobiyal etkinliđini incelemek için *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karřı cis- $[Ru(bpy)_2(Met)](PF_6)_2$ kompleksi sentezlemiřlerdir. Sentezlenen bu rutenyum kompleksi Gram negatif bakterilerden olan *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karřı aktivite gűstermezken yűksek konsantrasyonlarda *Escherichia coli* 'ye karřı dűřűk aktivite gűstermiřtir. Bu kompleksin daha çok Gram pozitif bakterilere etkili olduđu anlařılmıřtır. Binjawhar ve diđerleri (2024), rutenyum nanokompozileri ile yaptıkları çalıřmalarda, rutenyumun antimikrobiyal aktivitesinin enterokok biyofilmlerine karřı stafilokok biyofilmlerinden daha etkili olduđunu ve bu komplekslerin gűlű antimikrobiyal etkilerinin yanında olgun biyofilmi parçalama yeteneklerini gűzlemlemiřlerdir.

2.5 Tezin Amacı

Bu tez çalıřmasında Rutenyum CS27 ($Ru(4,4'$ -dikarboksi-2,2'-bipiridin)(4,4'-bis(3-etilheptil)-2,2'bipiridin(NCS)2) bileřiđinin *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909, *Bacillus cereus* ATCC 10976 ve *Enterococcus hirae* ATCC 10541 bakterileri űzerinde biyofilm inhibisyonu ve biyofilm parçalama performansı test edilmiřtir

3. YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri, Kimyasal Maddeler ve Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler: Nutrient Broth (LabM, LAB068), Tripto-Kazein Soy Broth (TSB-Biokar, BK046HA); Agar (Liofilchem, 611001); Luria Bartani-Miller Broth ((Trypton (CDH, 024290), Yeast ekstraktı (Acumedia MC001), Sodyum klorit (Merck, 1.06404.1000)), Todd Hewitt Broth Besiyeri ((Sodyum Bikarbonat (VWR,144-55-8), Disodyum Fosfat (Merck, 7558-79-4), Sodyum klorit (Merck, 1.06404.1000), Beef Extract Powder (Fluka, B4888-500G), Triptik Pepton (CDH, 024290), D(+) Glucose-Monohidrat (Merck, 1.08342.1000), Sükroz (Merck, 1.07651.1000), Agar (Liofilchem, 611001)), Müeller Hinton Agar (Acumedia, 7101A), Fosfat Tamponlu Salin (PBS, 0,01 M, pH 7,2), Dimetil sülfoksit (DMSO, Merck), Propidyum iyodür (PI, Biotium), D(+) Glikoz-Monohidrat (Merck, 1.08342.1000), 5-Siyano-2,3-bis(4-metilfenil)-2 H -tetrazolium klorür (CTC, Sigma-Aldrich, 94498-10MG-F), 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI, Serva)

Çalışmada kullanılan kitler: Hücre Proliferasyon Kiti XTT Bazlı Kolorimetrik Test (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) (Sartorius, 20-300-1000)

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar: Buzdolabı (Beko, Vestel), İnkübatör (Nüve, EN 120), İnkübatör (Nüve, ES 120), Otoklav (Nüve, OT 4060), Santrifüj (Alfagen Süper Mini Santrifüj 14K; Hettich, EBA 20), Terazı (Radwag, AS 220/C/2), Vorteks (Velp Scientifica), Spektrofotometre (Lange DR 5000), Mikroplaka Okuyucu (Biotek Epoch), Manyetik Karıştırıcı (WiseStir, MSH-20A), Pastör Fırını (Nüve, FN 120), Mikroskop (Olympus CX 31, Trinoküler mikroskop), Floresan Mikroskobu (Olympus BX53F, Fluorescent Microscope).

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri aşağıda verilmiştir:

Luria Bartani-Miller Broth Besiyeri (g/L)

- Tripton 10 g/L
- Yeast ekstraktı 5 g/L
- Sodyum klorür 5 g/L

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile suda çözdürülmüş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

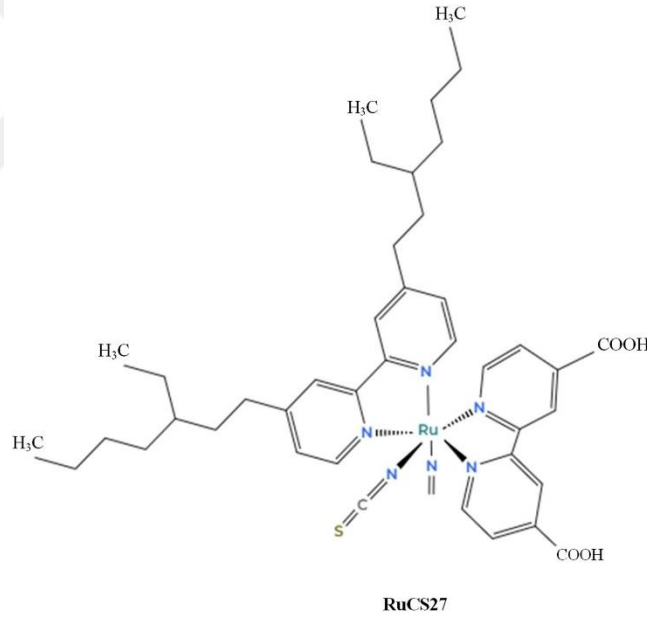
Todd Hewitt Broth Besiyeri

- Sodyum Bikarbonat 2g/L
- Disodyum Fosfat 0,5 g/L
- Sodyum Klorit 2 g/L
- Beef extract powder 10 g/L
- Triptik pepton 20 g/L
- D (+) Glikoz-Monohidrat 2,2 g/L
- Sükroz 1,03 g/L
- Agar 15 g/L

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile suda çözdürülmüş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

3.1.4 RuCS27 ve Test Bakterileri

Çalışmada kullanılan Rutenyum CS27 (Ru(4,4'-dikarboksi-2,2'-bipiridin)(4,4'-bis(3-etilheptil)-2,2'bipiridin(NCS)2) bileşiği Prof. Dr. Çiğdem ŞAHİN ve ekibi tarafından daha önce gerçekleştirdikleri bir çalışmada sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (Şekil 3.1) (Sahin ve diğ. 2010). Bu çalışmada kullanılan organizmalar: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909 *Bacillus cereus* ATCC 10976, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 olup suşlar Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı bakteri stoklarından temin edilmiştir.



Şekil 3.1: Rutenyum CS27'nin moleküler yapısı (Sahin ve diğ. 2010).

3.2 Metot

3.2.1 Rutenyum CS27'nin Biyofilm İnhibisyon Etkisi

Rutenyum kompleksinin (Ru(4,4'-dikarboksi-2,2'-bipiridin)(4,4'-bis(3-etilheptil)-2,2'-bipiridin(NCS)₂) biyofilm inhibisyon etkisi, XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) indirgeme kiti yardımıyla 96-kuyulu mikrolakalarda belirlenmiştir.

Çalışmalarda kullanılmak üzere RuCS27, %100 saf dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözdürülerek 10 mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Daha sonra ana stok seyreltilerek RuCS27'nin (40 µM, 50 µM, 55 µM, 60 µM, 65 µM, 70 µM, 80 µM, 90 µM, 100 µM) 9 farklı konsantrasyonu elde edilmiştir. DMSO oranı, 200 µl toplam hacimde %1 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kullanılacak bakteri türleri için farklı besiyerleri kullanılmıştır. Buna göre, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090, *Bacillus cereus* ATCC 10976 ve *Enterococcus hirae* ATCC 10541 bakterileri Tripto-Kazein Soy Broth besiyerinde; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 ve *Escherichia coli* ATCC 8739 bakterileri Luria Bartani-Miller Broth besiyerinde; *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909 bakterisi Todd Hewitt besiyerinde 37°C'de aktiveleştirilen bakteri kültürlerinin hücre yoğunlukları 0,5 McFarlanda göre ayarlanmıştır. Daha sonra, her bir kuyuya 20 µl bakteri kültürü, 2 µl rutenyum kompleksi (40 µM, 50 µM, 55 µM, 60 µM, 65 µM, 70 µM, 80 µM, 90 µM, 100 µM) konulmuştur. Toplam hacim 200 µl olacak şekilde besiyeri ilave edilerek mikrolakalar 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda süpernetant uzaklaştırılarak fosfat tamponu (PBS, 0,01 M, pH 7,2) ile her bir kuyu nazikçe 2 kez yıkanarak biyofilme yapışmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyulara XTT kiti içerisindeki solüsyonlar karıştırılarak her bir kuyuya 50 µl XTT solüsyonu ve 100 µl PBS eklenmiş olup mikrolakalar 37°C'de 5 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda biyofilm içindeki canlı hücrelerin XTT'yi metabolik olarak değiştirmesi sonucunda oluşan suda çözünür formdaki turuncu renkli formazanın miktarı 450-630 nm'de mikrolaka okuyucuda ölçülmüştür. Sonuçlar aşağıda belirtilen formülle hesaplanmış ve biyofilm inhibisyonu % olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Biyofilm İnhibisyonu (\%)} = 100 - [(\text{Örnek OD} / \text{Kontrol OD}) \times 100]$$

Tüm testler duplike olacak şekilde çalışılmıştır. Aynı işlemler RuCS27 içermeyen kontrol grubuna da uygulanmıştır. Rutenyum içermeyen kontrol grubun metabolik aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.

3.2.2 Rutenyum CS27'nin Oluşmuş Biyofilmi Parçalama Etkisi

RuCS27'nin biyofilmi parçalama aktivitesi için, en iyi biyofilm inhibisyon etkisi gösterdiği *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 bakterileri Luria Bartani-Miller Broth besiyerinde, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090 ve *Bacillus cereus* ATCC 10976 suşları Tripto-Kazein Soy Broth besiyerinde geliştirilerek önceden biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Daha sonra oluşmuş biyofilmin bulunduğu her kuyucuğa, 2 µl farklı konsantrasyonlarda (40 µM ve 65 µM) RuCS27 ilave edildikten sonra mikropalakalar 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ilerleyen deney basamakları yukarıda belirtildiği gibi yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda belirtilen formülle hesaplanmış ve biyofilm degradasyonu % olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Biyofilm Degradasyon (\%)} = 100 - [(\text{Örnek OD} / \text{Kontrol OD}) \times 100]$$

3.2.3 Floresan Mikroskop Analizi

RuCS27'nin biyofilmleri parçalama etkisinin incelenmesi için floresan mikroskop analizi yapılmıştır. Bu analizde iki farklı boyama yöntemi kullanılmıştır:

Propidyum iyodür (PI) boyama yönteminde; *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* ATCC 8739, *L. monocytogenes* NCTC 11994, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. faecalis* ATCC 19433 suşları 12 mm'lik steril yuvarlak lamel ve 40 µM rutenyum içeren 6-kuyulu mikropalakalarda 37 °C'de 48 saat inkübe edilerek lamel yüzeyinde biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Süre sonunda lamel yüzeyine tutunamayan hücreler dH₂O ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Lameller tespit işleminin ardından Propidyum iyodür (PI) boyası ile kaplanmıştır. PI karışımı, 100 µL dH₂O içerisinde 1:3 oranında hazırlanmıştır. Boya solüsyonunda karanlık odada 20 dakika bekletilen lameller

immersiyon yağı damlatılarak Floresan mikroskopta 100X büyütmede incelenmiştir (Feng ve diğ. 2018, Sahin ve diğ. 2021).

DAPI-CTC boyama yönteminde; *E. coli* ATCC 8739 bakterisi 12 mm`lik steril yuvarlak lamel ve 40 µM rutenyum içeren 6-kuyulu mikropalakalarda 37°C`de 48 saat inkübe edilerek lamel yüzeyinde biyofilm oluşumu sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların içerisindeki lameller 2 ml fosfat tamponu ile yıkanarak lameller farklı bir kuyucuğa alınarak üzerine 890 µl fosfat tamponu (PBS, 0,01 M, pH 7,2) eklenmiştir. Karanlık ve steril şartlarda kuyucuk üzerine 100 µl 5-Siyano-2,3-bis(4-metilfenil)-2 *H* -tetrazolyum klorür (CTC, Sigma-Aldrich, 94498-10MG-F) eklenerek 28°C`de 4 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yine karanlık ortamda 110 µl 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI, Serva) boyası ilave edilmiş ve 28°C`de 1 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklara steril 3 ml bidistile su ilavesinin ardından lamel lam üzerine alınarak fiksasyon işlemi yapılmıştır. Lamel üzerine immersiyon yağı damlatılarak floresan mikroskopta 100X objektifte DAPI için 330-380 nm`de ve CTC için 450-490 nm dalga boyunda inceleme yapılmıştır.

Biyofilmi incelemek için yapılan işlem basamaklarına benzer şekilde planktonik hücrelere RuCS27`nin etkisi floresan mikroskopta incelenmiştir. Biyofilmden farklı olarak planktonik hücreler için deney ortamı steril tüp içerisinde gerçekleştirilmiş ve deneyde kullanılan çözeltiler ve boyalar tüpe eklenerek vortekslenmiştir. Ardından 14.000 rpm`de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından oluşan çökelti kısmından lam üzerine alınarak fiksasyon yapılmıştır. Lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak floresan mikroskopta 100X objektifte DAPI için 330-380 nm`de ve CTC için 450-490 nm dalga boyunda inceleme yapılmıştır.

3.2.4 İstatiksel Analiz

Çalışmalarda tüm deneyler iki kez gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama ± stardart sapma olarak bildirilmiştir. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 9.0 uygulaması kullanılmıştır. Kontrol ve doz uygulanan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar çift yönlü varyans analizi (Two way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ardından Tukey testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Rutenyum CS27'nin Antibiyofilm ve Metabolik Aktivitesinin Belirlenmesi

Biyofilm, mikroorganizmaların topluluk oluşturarak bulunduğu ortamdaki stres koşullarına karşı dayanıklılık kazanmasını sağlayan bir yapıdır (Serra ve diğ. 2014, Rumbaugh ve Sauer 2020). Oluşan bu topluluk, mikroorganizmaların planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında besin yetersizliği, pH değişiklikleri ve bakteriyofajlarla karşılaşma gibi stres faktörlerine karşı hayatta kalma oranını artırır (Costerton ve diğ. 1995, Rumbaugh ve Sauer 2020). Biyofilm yapısı oluştururken mikroorganizmalar, EPS adı verilen ekstraselüler matriks üreterek bir yüzeye yapışır ve orada çoğalmalarıyla birlikte dayanıklı mikro koloniler oluştururlar (Schilcher ve Horswill 2020). Biyofilmlerin bu dayanıklı yapısı hastalıkların tedavisini zorlaştırmakla kalmayıp beraberinde periodontitis, kistik fibröz pnömonisi, kronik idrar yolu enfeksiyonları, tonsillit, kronik rinosinüzit, kronik orta kulak iltihabı ve kronik yara enfeksiyonları birçok kronik enfeksiyona sebep olur (Hall-Stoodley ve diğ. 2009). Patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapılar, bakterilerin antibiyotik gibi birçok kimyasala karşı dirençli olmalarına katkı sunduğu için, biyofilm ile mücadelenin önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Patojenlere karşı antibiyotiklerin etki yetersizliği de patojenlerle mücadelede yeni bileşiklerin yoğun olarak araştırılmasına yol açmıştır. Bu amaçla kimyasal olarak sentezlenen metal kompleksler arasında yer alan rutenyum bileşikleri, biyolojik olarak öne çıkan üstün özellikleri nedeniyle biyofilm ile mücadelede de bilim camiasının dikkatini çekmiştir. Rutenyum bileşiğinin yapısına eklenen farklı ligandlar, rutenyum komplekslerin etkinliğinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca sağlıklı hücrelere toksik etkisinin olmaması da tercih edilirliliğini arttırmaktadır.

Bu bağlamda sunulan çalışmada bipyridin ligandı içeren Rutenyum kompleksi RuCS27'nin *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909, *Bacillus cereus* ATCC 10976 ve *Enterococcus hirae* ATCC 10541 bakterilerinin metabolik aktivitelerine ve oluşturdukları biyofilme karşı

antibiyofilm etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, her bir bakteri kültürü (0,5 McFarland) ve besiyeri içeren 96 kuyucuklu mikrolakalara farklı konsantrasyonlarda RuCS27 eklenerek 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulara XTT karışımından eklenerek 37°C’de 5 saat karanlıkta inkübe edilmiş ve kuyucuklardaki renk değişiklikleri 450 ve 630 nm’de mikrolaka okuyucuda ölçülerek RuCS27’nin bakteriler üzerindeki antibiyofilm ve metabolik aktivitesi hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan 9 bakteri türünden ikisi (*E. hirae* ATCC 10541 ve *S. parasanguinis* ATCC 15909) üzerine RuCS27’nin antibiyofilm aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Geriye kalan 7 bakteriden 5’inde (*P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* ATCC 8739, *L. monocytogenes* NCTC 11994, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. faecalis* ATCC 19433) en yüksek antibiyofilm aktivitesi 40 µM RuCS27 içeren ortamda iken, 2’sinde (*L. innocua* (6a) ATCC 32090 ve *B. cereus* ATCC 10976) 65 µM RuCS27 içeren ortamda gözlenmiştir.

Tablo 4.1: RuCS27'nin antibiyofilm aktivitesi

Bakteriler	Antibiyofilm aktivite (%)								
	40 µM	50 µM	55 µM	60 µM	65 µM	70 µM	80 µM	90µM	100 µM
<i>P. aeruginosa</i> PA01	63,27 ± 0,00 ^a	57,00 ± 0,00 ^a	53,38 ± 3,29 ^a	51,01 ± 2,54 ^a	49,39 ± 0,00 ^a	59,4 ± 0,00 ^a	48,01 ± 0,14 ^a	45,85 ± 0,16 ^a	42,62 ± 0,63 ^a
<i>E. coli</i> ATCC 8739	92,59 ± 1,78 ^a	84,78 ± 0,76 ^a	77,68 ± 0,77 ^a	74,92 ± 0,97 ^a	67,39 ± 1,34 ^a	61,46 ± 1,44 ^a	62,78 ± 0,00 ^a	57,67 ± 3,50 ^a	52,50 ± 5,92 ^a
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994	42,61 ± 1,97 ^a	35,69 ± 0,01 ^a	33,19 ± 0,71 ^a	30,28 ± 0,41 ^a	27,99 ± 0,13 ^a	25,01 ± 0,12 ^a	21,44 ± 0,65 ^a	20,00 ± 0,18 ^a	18,51 ± 1,48 ^a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	82,68 ± 1,56 ^a	77,36 ± 2,11 ^a	71,08 ± 0,96 ^a	67,61 ± 1,37 ^a	62,19 ± 0,43 ^a	59,23 ± 1,42 ^a	54,54 ± 1,53 ^a	52,19 ± 2,13 ^a	51,91 ± 0,98 ^a
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	95,44 ± 1,70 ^a	83,99 ± 2,24 ^a	76,18 ± 1,61 ^a	68,95 ± 0,71 ^a	60,44 ± 2,02 ^a	51,13 ± 0,41 ^a	51,07 ± 0,36 ^a	54,62 ± 0,59 ^a	53,38 ± 1,01 ^a
<i>L. innocua (6a)</i> ATCC 32090	14,81 ± 1,42 ^a	19,54 ± 0,55 ^a	25,49 ± 2,07 ^a	27,24 ± 2,11 ^a	43,71 ± 0,88 ^a	25,75 ± 0,36 ^a	22,43 ± 1,38 ^a	19,31 ± 0,22 ^a	18,41 ± 0,42 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 10976	20,27 ± 0,52 ^a	27,66 ± 0,77 ^a	32,17 ± 0,92 ^a	39,36 ± 0,71 ^a	43,15 ± 1,79 ^a	36,26 ± 0,57 ^a	31,00 ± 1,12 ^a	24,83 ± 1,16 ^a	20,06 ± 0,37 ^a
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]
<i>S. parasanguinis</i> ATCC 15909	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]	— [*]

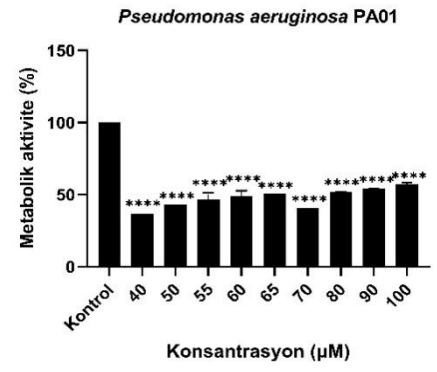
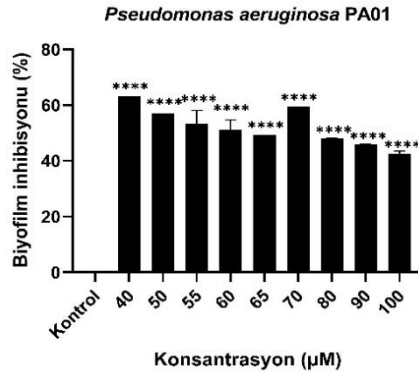
*: antibiyofilm aktivite yok a: ****: p<0,0001 seviyelerinde anlamlı fark tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: RuCS27'nin metabolik aktivitesi

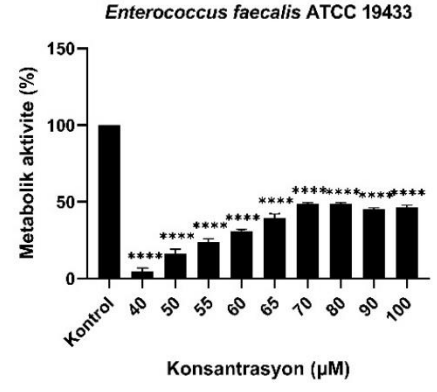
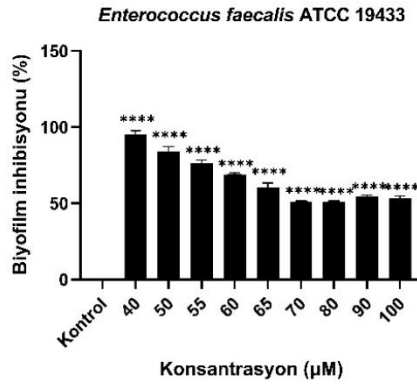
Bakteriler	Metabolik aktivite (%)								
	40 µM	50 µM	55 µM	60 µM	65 µM	70 µM	80 µM	90µM	100 µM
<i>P.aeruginosa</i> PA01	36,73 ± 0,00 ^a	43,00 ± 0,00 ^a	46,62 ± 3,29 ^a	48,99 ± 2,54 ^a	50,61 ± 0,00 ^a	40,55 ± 0,00 ^a	52,00 ± 0,14 ^a	54,15 ± 0,16 ^a	57,38 ± 0,63 ^a
<i>E.coli</i> ATCC 8739	7,42 ± 1,78 ^a	15,23 ± 0,76 ^a	22,33 ± 0,77 ^a	25,09 ± 0,96 ^a	32,62 ± 1,34 ^a	38,55 ± 1,44 ^a	37,22 ± 0,00 ^a	42,33 ± 3,50 ^a	47,50 ± 5,92 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	57,40 ± 1,97 ^a	64,31 ± 0,01 ^a	66,81 ± 0,71 ^a	69,73 ± 0,41 ^a	72,01 ± 0,13 ^a	74,99 ± 0,12 ^a	78,57 ± 0,66 ^a	80,01 ± 0,17 ^a	81,49 ± 1,48 ^a
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	17,33 ± 1,56 ^a	22,64 ± 2,11 ^a	28,92 ± 0,96 ^a	32,39 ± 1,37 ^a	37,81 ± 0,43 ^a	40,77 ± 1,42 ^a	45,46 ± 1,53 ^a	47,81 ± 2,13 ^a	48,09 ± 0,98 ^a
<i>E.faecalis</i> ATCC 19433	4,56 ± 1,70 ^a	16,01 ± 2,24 ^a	23,83 ± 1,62 ^a	31,05 ± 0,71 ^a	39,57 ± 2,02 ^a	48,87 ± 0,41 ^a	48,93 ± 0,36 ^a	45,38 ± 0,59 ^a	46,62 ± 1,01 ^a
<i>L. innocua</i> (6a) ATCC 32090	85,17 ± 1,41 ^a	80,47 ± 0,55 ^a	74,52 ± 2,07 ^a	72,76 ± 2,11 ^a	56,29 ± 0,88 ^a	74,25 ± 0,36 ^a	77,57 ± 1,38 ^a	80,70 ± 0,22 ^a	81,59 ± 0,42 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 10976	79,74 ± 0,52 ^a	72,35 ± 0,77 ^a	67,83 ± 0,92 ^a	64,14 ± 4,21 ^a	56,85 ± 1,79 ^a	63,74 ± 0,57 ^a	69,01 ± 1,11 ^a	75,18 ± 1,16 ^a	79,94 ± 0,37 ^a
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>S. parasanguinis</i> ATCC 15909	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

^a: ***: p<0,0001 seviyelerinde anlamlı fark tespit edilmiştir.

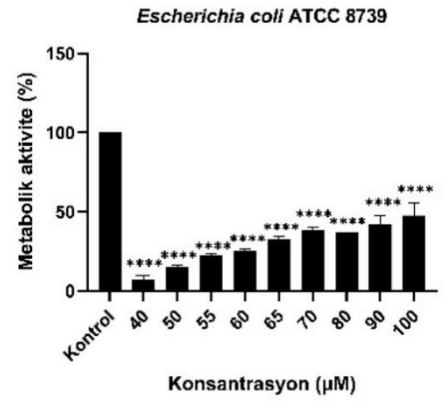
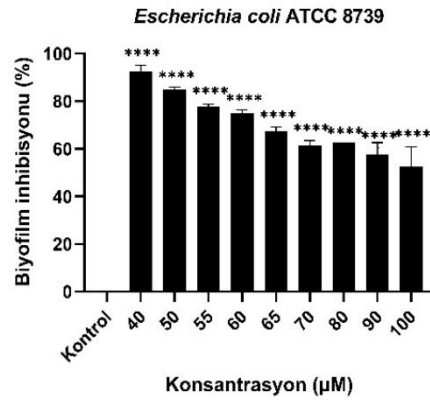
A



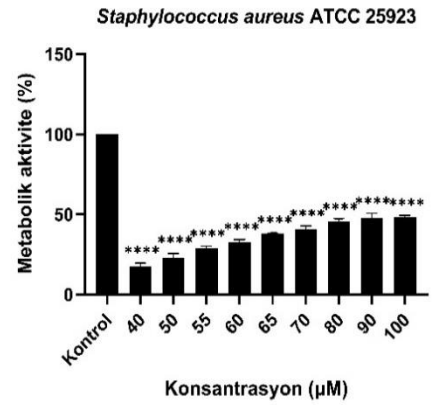
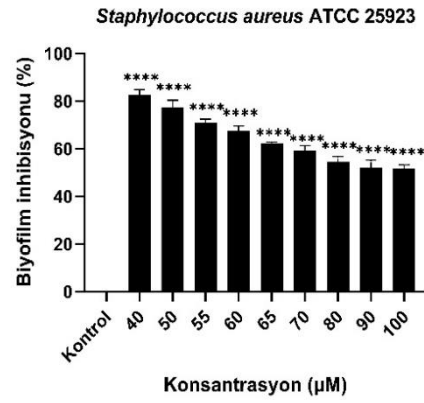
B



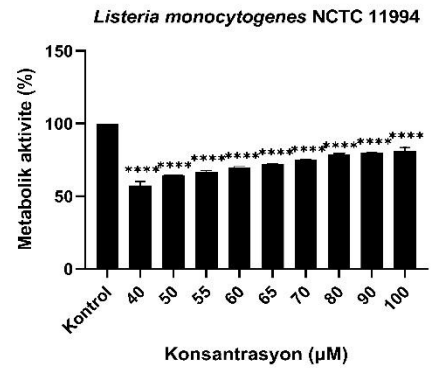
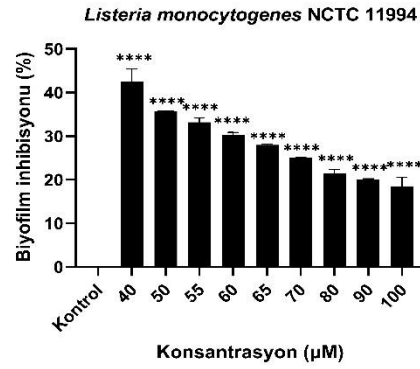
C



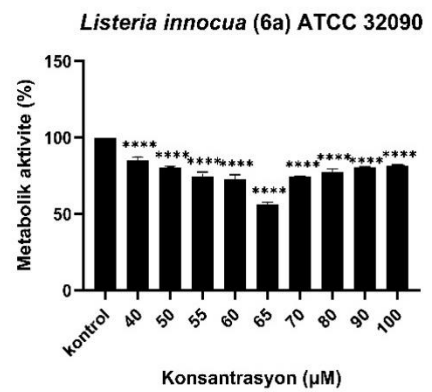
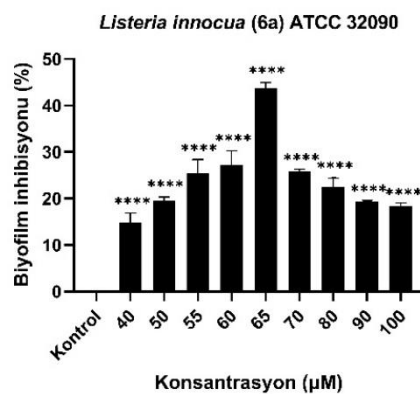
D



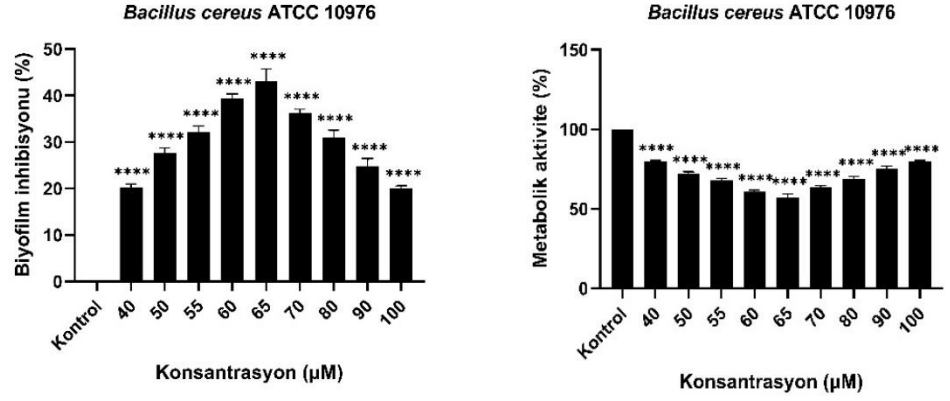
E



F



G



Şekil 4.1: RuCS27'nin bakteriyel biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi ****: $p < 0,0001$ A: *P. aeruginosa* PAO1'nin biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi; B: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433'in biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi; C: *Escherichia coli* ATCC 87392'nin biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi; D: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'un biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi; E: *Listeria monocytogenes* NCTC 11994'in biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi; F: *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090'nin biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi; G: *Bacillus cereus* ATCC 10976'nin biyofilm inhibisyonu ve metabolik aktivitesi.

Genel olarak çalışmada kullanılan test organizmaların oluşturduğu biyofilmin inhibisyonu açısından değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlardan, rutenyum bileşiğimizin etkili bir ajan olduğu görülmektedir. XTT indirgeme testi ile yapılan biyofilm inhibisyon etkisi ve metabolik aktivite analizine göre, rutenyum bileşiği *E. hirae* ATCC 10541 ve *S. parasanguinis* ATCC 15909 türleri hariç diğer bakterilerin biyofilmini etkili bir şekilde azaltmıştır (Tablo 4.1). RuCS27'in farklı türlerde farklı dozlarda etkili olduğu ve literatürde rapor edilen rutenyum kompleksleriyle antibiyofilm etki açısından yarışır özellikte olduğu sonucuna varılmıştır.

RuCS27'nin deneylerde kullanılan tüm bakterilerin 48 saatlik biyofilm oluşum aşamasında gösterdiği en yüksek biyofilm inhibisyon aktivitesi sırasıyla şu şekildedir; *E. faecalis* ATCC 19433 için $95,44 \pm 1,70$, *E. coli* ATCC 8739 için $92,59 \pm 1,78$, *S. aureus* ATCC 25923 için $82,68 \pm 1,56$, *P. aeruginosa* PAO1 için $63,27 \pm 0,00$, *L. innocua* (6a) ATCC 32090 için $43,71 \pm 0,88$, *B. cereus* ATCC 10976 için $43,15 \pm 1,79$ ve *L. monocytogenes* NCTC 11994 için $42,61 \pm 1,97$ 'dir. Verilerde görüldüğü üzere RuCS27 en yüksek biyofilm inhibisyon etkisini *E. faecalis* ATCC 19433 ($95,44 \pm 1,70$) ve *E. coli* ATCC 8739 ($92,59 \pm 1,78$) bakterilerine karşı gösterirken, *E. hirae* ATCC 10541 ve *S. parasanguinis* ATCC 15909 bakterilerinde herhangi bir inhibisyon etki görülmemiştir.

En yüksek biyofilm inhibisyon aktivitesine ulaşılan RuCS27 konsantrasyonunda gelişen patojen bakterilerin %7,42-%56,85 arasında metabolik olarak aktif oldukları görülmüştür. Genel olarak bakterilerin metabolik aktivitesi; *E. faecalis* ATCC 19433 için %4,56 ± 1,70 (40 µM), *E. coli* ATCC 8739 için %7,42 ± 1,78 (40 µM), *S. aureus* ATCC 25923 için %17,33 ± 1,56 (40 µM), *P. aeruginosa* PA01 için %36,73 ± 0,00 (40 µM), *L. innocua* (6a) ATCC 32090 için % 56,29 ± 0,88 (65 µM), *B. cereus* ATCC 10976 için % 56,85 ± 1,79 (65 µM) ve *L. monocytogenes* NCTC 11994 için %57,40 ± 1,97 (40 µM)'dir. RuCS27'nin metabolik aktivitesini en fazla etkilediği bakteriler *E. faecalis* ATCC 19433 (%4,56 ± 1,70) ve *E. coli* ATCC 8739 (%7,42 ± 1,78) olmuştur. *E. hirae* ATCC 10541 ve *S. parasanguinis* ATCC 15909'in rutenyum içeren ortamda metabolik olarak aktifliğini (%100) devam ettirmesi dikkat çekicidir.

RuCS27, *P. aeruginosa* PA01 biyofilmine karşı 40 µM gibi düşük konsantrasyonda maksimum antibiyofilm etkisi (%63,27 ± 0,00) göstermiştir. Bu konsantrasyonda bakterinin metabolik olarak %36,73 oranında aktif olduğu görülmüştür. Ayrıca rutenyumun artan konsantrasyonlarının aksine biyofilm inhibisyonunda artış olmaması dikkat çekicidir. Bu sonuca göre, deneysel çalışma yapılmamış olmakla birlikte *Pseudomonas* hücrelerinin ya biyofilm yapısı içerisinde kimyasal maddeye karşı tolerans geliştirmiş olmasından ya da kimyasal maddenin biyofilm yapının içine yeterince nüfuz etmemesinden kaynaklanmış olabilir. Rutenyum komplekslerinin bağlandıkları benzimidazol ve türevi olan ligandların *P. aeruginosa* PA01 bakterisinin planktonik formlarına hiç zarar vermeden biyofilm oluşumunu engelleyerek antibiyofilm aktivite sergilediği bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sambanthamoorthy diđ. 2011, Lee ve diđ. 2012, Czerwonka ve diđ. 2019). Rutenyum komplekslerinin, *P. aeruginosa* biyofilm kolonilerinin mimari yapısını değiştirerek bakterilerin mikro koloniler halinde toplanmasına yol açtığı ve iki farklı komplekste de %71 ve %78 oranında antibiyofilm aktivite ile biyofilm büyümesi inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Jabłońska-Wawrzycka ve diđ. 2020). Araştırmacıların bildirdiğine göre, *P. aeruginosa* PA01 bakterisi 1 mM rutenyum ile muamele edildiğinde, rutenyum kompleksinin biyofilm oluşumunu %75-83 oranında inhibe etmiş ve bu konsantrasyon 0,5 mM iken en fazla %15-%46 oranında biyofilmi azaltabilmiştir (Jabłońska-Wawrzycka ve diđ. 2021). Bu alışmalar incelendiğinde görülmektedir ki, RuCS27 diğer rutenyum komplekslerine göre yaklaşık 25 kat daha az konsantrasyonda *P. aeruginosa* PA01 biyofilmini hemen hemen aynı oranda inhibe

etmektedir. Bu da RuCS27 kompleksimizin literatürde rapor edilen diğer rutenyum komplekslerinden çok daha etkili olduğunu göstermektedir.

Başka bir çalışmada, mikrokapsüllenmiş RuL3'ün, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* biyofilm biyokütlesine karşı antibiyofilm etkisi incelenmiş ve yaklaşık %90 azalmayla maksimum etki *E. faecalis* biyofilmi üzerinde görülmüştür. RuL3'ün *E. coli* bakterisinin hücre zarı ve hücre duvarına zarar vererek bakteriyi inhibe ettiği de SEM analizleriyle gösterilmiştir (Claessen ve diğ. 2019, Khelissa ve diğ. 2021). Benzer şekilde, sentezlenen $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dmb})_2(\text{PIPBT})](\text{PF}_6)_2$ (Ru-2) kompleksi *S. aureus* biyofilmini 0,25xMİK, 0,5xMİK ve 0,75xMİK konsantrasyonlarda sırasıyla %17,9, %42 ve %54,2 oranında inhibe etmiştir (Deng ve diğerleri 2024). Başka bir çalışmada ise sentezlenen üç farklı rutenyum kompleksi ($[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{BTPIP})](\text{PF}_6)_2$ (Ru(II)-1), $[\text{Ru}(\text{dbp})_2(\text{BTPIP})](\text{PF}_6)_2$ (Ru(II)-2), $[\text{Ru}(\text{dpa})_2(\text{BTPIP})](\text{PF}_6)_2$ (Ru(II)-3)) *Staphylococcus aureus* bakterisinin gelişimini çok düşük konsantrasyonlarda inhibe edebilmiştir (Wang ve diğ. 2021). Jabłońska-Wawrzycka ve diğerleri (2021), ligandları birbirinden farklı 3 rutenyum kompleksinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* LES B58 (klinik) suşlarına etkisini incelemişler ve rutenyum komplekslerinin suşlar arasında farklı aktivite gösterdiği sonucuna varmışlardır. Test edilen tüm suşlara karşılık en etkili olan bileşik Ru (III) kompleksi olmuştur. *Pseudomonas* suşunun direncini incelediklerinde Ru (III) kompleksinin 0,5 mM konsantrasyonu, kontrole kıyasla hücre büyümesini %72 azaltmıştır. Bolhuis ve diğerleri (2011), polipiridil rutenyum (II) komplekslerinin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı önemli bakterisidal aktivite sergilediğini bildirmiş ve bazı komplekslerin 2 µg/mL kadar düşük MİK değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bu ve diğerleri (2020)'nin sentezlediği rutenyum kompleksi *Staphylococcus aureus*'a karşı 0,016 mg/mL MİK değerinde biyofilmi inhibe etmiştir. Ayrıca, rutenyum kompleksinin *Staphylococcus aureus*'un bazı aminoglikozid antibiyotiklere (kanamisin ve gentamisin) duyarlılığını da arttırdığı bildirilmiştir. Andrade ve diğerleri (2020), rutenyum kompleksinin antibiyofilm ve antibakteriyel aktivitesini araştırmak için yaptıkları çalışmada; 15,6 ve 62,5 µg/ml arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve 62,5-125 µg/ml arasında değişen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri ile gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite sergileyen $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bqdi})]^{2+}$ (RuNN)'nin kompleksi,

hem *Staphylococcus aureus* biyofilm oluşumunu engellemiş hem de olgun biyofilmi bozmuştur. Literatürde verilen rutenyum konsantrasyonlarıyla kıyaslandığında, RuCS27'nin düşük konsantrasyonlarda ulaştığı yüksek derecede biyofilmi inhibe etme yeteneği, antibiyofilm ajan olma potansiyelinin bir kanıtıdır. Literatürde bu hipotezi destekleyen çalışmalar sunulmuştur.

RuCS27, *L. monocytogenes* NCTC 11994 biyofilminin maksimum %18,51-42,61'sini inhibe etmiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1.E). Konsantrasyon artışına bağlı olarak biyofilm inhibisyon yüzdesindeki düşüş hem bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğiyle hem de RuCS27'nin stabilitesiyle ilişkili olabilir. *L. monocytogenes* bakterisi 40 µM RuCS27 içeren ortamda geliştirildiğinde, bakteriyel biyofilmin %42,61'si inhibe olmuştur. Bu konsantrasyonda bakterinin %57,40 oranında metabolik olarak aktif olduğu görülmüştür. Khelissa ve diğerleri (2021), rutenyumun serbest ve kapsüllenmiş yapısının *L. monocytogenes* biyofilmi üzerine antibiyofilm etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada, serbest RuL3 kompleksi hücre sayısını 4,8 log CFU/cm²'ye düşürürken, kapsüllenmiş RuL3 log3,0 CFU/cm²'ye düşürmektedir. Literatürde bu konuyla ilgili kısıtlı çalışmalar olsa da *L. monocytogenes* NCTC 11994'in farklı metal komplekslere verdiği bazı tepkilere örnek olarak; Vázquez-Armenta ve diğerleri (2021), Makrosiklik ligand (edtaod) ve asiklik ligand (edtabz) sentezleyerek Cu²⁺ ve Fe³⁺ kompleksleri oluşturmuşlardır ve bu maddelerin bakteriler üzerindeki antibiyofilm etkilerini incelemişlerdir. *L. monocytogenes* biyofilmi, 1 mM konsantrasyonda makrosiklik ligandına orta düzeyde antibiyofilm etki gösterirken, Fe³⁺ ile kompleks oluşturulduğunda %79,7-83,8'lik seviyelerine kadar çıkarak yüksek antibiyofilm etki göstermiştir. Fe³⁺ ile kompleks oluşturulduğunda gösterdiği antibiyofilm etkinin aksine Cu²⁺ kompleksinde hiç antibiyofilm etki görülmemiştir.

Literatür bilgilerimize göre, test organizmaları arasında yer alan *L. innocua* (6a) ATCC 32090 ve *B. cereus* ATCC 10976 bakterilerinin oluşturduğu biyofilmin rutenyum kompleksine karşı antibiyofilm aktivitesi ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. *L. innocua* (6a) ATCC 32090 ve *B. cereus* ATCC 10976 bakterilerinde 65 µM konsantrasyonda en yüksek antibiyofilm etki (sırasıyla; %43,71 ve %43,15) görülmüştür.

4.2 Rutenyum CS27'nin Oluşmuş Biyofilmi Parçalama Etkisi

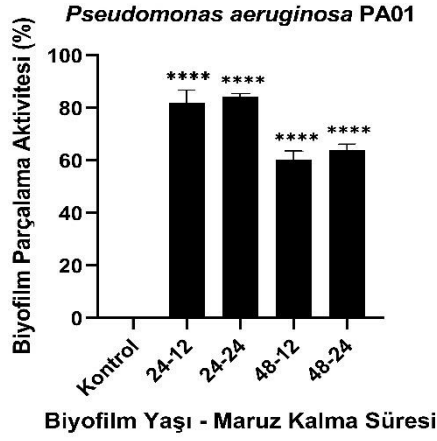
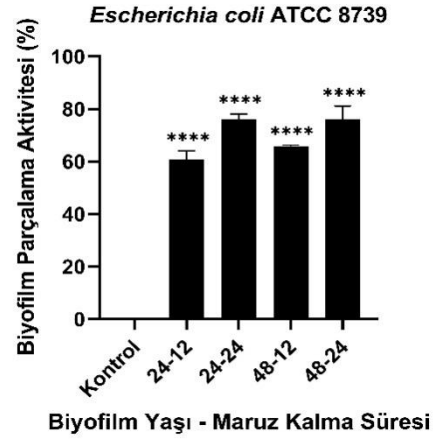
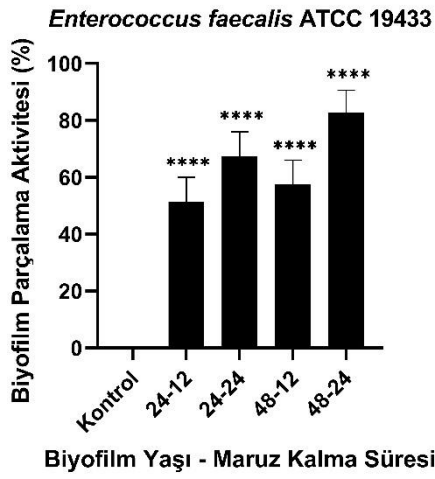
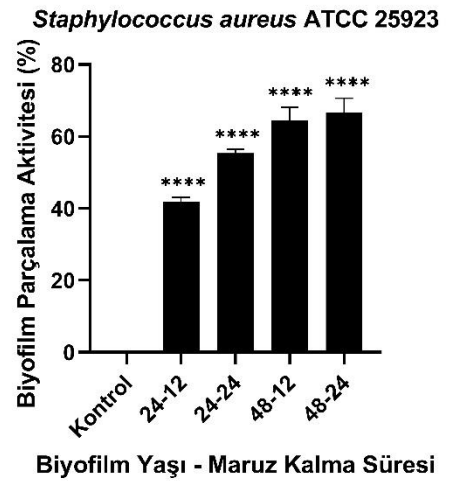
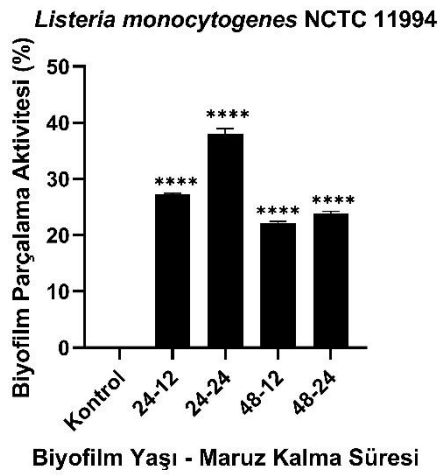
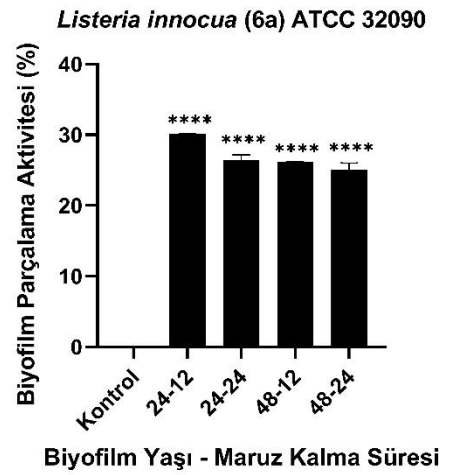
Patojen bakterilerin, oluşmuş biyofilm yapı içinde daha korunabilir olmalarından dolayı, biyofilm yapıların parçalanması önemli bir diğer konudur. Oluşmuş biyofilm yapıların kararlı ve dirençli olması nedeniyle, biyoilmmin kimyasal yollarla bozunması daha zordur. Bu nedenle doğal ya da sentezlenen antibiyofilm ajanların aynı zaman da oluşmuş biyofilmi parçalama etkisine sahip olması istenilen özellikler arasında yer alır. Biyoilmmin bozunması/uzaklaştırılması çalışmalarında dikkat edilmesi gerekli önemli noktalardan biri kimyasal maddenin konsantrasyonundan daha çok tedavi süresidir. Kimyasal maddelerin yüksek veya düşük konsantrasyonları biyofilmi enfekte etmek ve yapıya nüfuz etmek için yeterli olmayabilir. Bu nedenle, tedavi süresi bakteriyel biyofilm yıkımı için madde konsantrasyonundan daha önemli bir faktör olarak değerlendirilmelidir. Çünkü tedavi süresine göre doğru konsantrasyonların tespit edilmesi gereklidir.

RuCS27'nin oluşmuş biyofilmi parçalama incelemek için antibiyofilm çalışmasından farklı olarak 96 kuyulu mikroplakalara 0,5 McFarlanda göre ayarlanmış hücre yoğunluğuna sahip bakteri kültürleri ve besiyerleri eklenerek farklı inkübasyon sürelerinde (24 ve 48 saat) biyofilm geliştirilmiştir. Her bir bakteri için RuCS27'nin maksimum biyofilm inhibisyon dozu önceden oluşturulan biyoilmmler üzerine eklenmiş ve biyoilmmler değişen süreler boyunca (12 ve 24 saat) RuCS27 ile maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir.

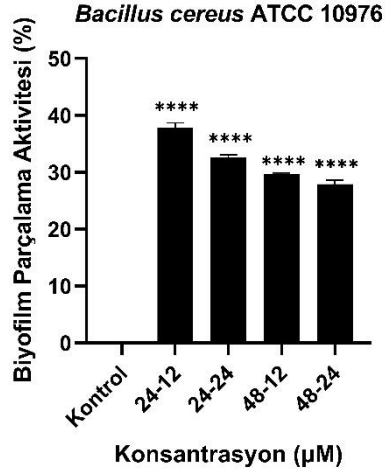
Tablo 4.3: RuCS27'nin oluşmuş biyofilmi parçalama aktivitesi

Bakteriler ve RuCS27 Konsantrasyonları	Biyofilm Oluşmuş Biyofilmi Parçalama Aktivitesi (%)			
	Biyofilm Yaşı-Maruz Kalma Süresi (Saat-Saat)			
	24-12	24-24	48-12	48-24
<i>P.aeruginosa</i> PA01 (40 µM RuCS27)	81,98 ± 3,40 ^a	84,41 ± 0,73 ^a	60,24 ± 2,45 ^a	64,02 ± 1,53 ^a
<i>E.coli</i> ATCC 8739 (40 µM RuCS27)	60,75 ± 2,32 ^a	76,14 ± 1,39 ^a	65,84 ± 0,33 ^a	76,18 ± 3,53 ^a
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994 (40 µM RuCS27)	27,28 ± 0,13 ^a	38,07 ± 0,65 ^a	22,17 ± 0,19 ^a	23,84 ± 0,28 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (40 µM RuCS27)	41,77 ± 0,93 ^a	55,37 ± 0,75 ^a	64,59 ± 2,55 ^a	66,64 ± 2,83 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (40 µM RuCS27)	51,41 ± 6,11 ^a	61,6 ± 0,00 ^a	57,58 ± 5,96 ^a	82,91 ± 5,47 ^a
<i>L. innocua</i> (6a) ATCC 32090 (65 µM RuCS27)	30,19 ± 0,01 ^a	26,41 ± 0,53 ^a	26,13 ± 0,01 ^a	25,1 ± 0,65 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 10976 (65 µM RuCS27)	37,84 ± 0,60 ^a	32,68 ± 0,26 ^a	29,76 ± 0,11 ^a	27,95 ± 0,5 ^a

^a. ***: p<0,0001 seviyelerinde anlamlı fark tespit edilmiştir.

A**B****C****D****E****F**

G



Şekil 4.2: RuCS27'nin oluşmuş biyofilmi parçalama aktivitesi. ****: $p < 0.0001$ A: *P. aeruginosa* PAO1 biyofilminde 40 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi; B: *Escherichia coli* ATCC 87392 biyofilminde 40 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi; C: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 biyofilminde 40 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi; D: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 biyofilminde 40 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi; E: *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 biyofilminde 40 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi; F: *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090 biyofilminde 65 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi; G: *Bacillus cereus* ATCC 10976'nin biyofilminde 65 mikromolar RuCS27'nin biyofilim parçalama aktivitesi.

RuCS27'nin biyofilm inhibisyon etkisine benzer şekilde biyofilm parçalama aktivitesi *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 bakterileri üzerinde diğer bakterilere kıyasla daha fazlaydı. Her iki sonuç değerlendirildiğinde RuCS27'nin bu türler üzerinde seçici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Etki yüzdeleri dikkate alındığında genel olarak RuCS27'nin oluşmuş biyofilmi parçalama aktivitesi, oluşmakta olan biyofilmi inhibisyon etkisiyle kıyaslandığında azaldığı da görülmüştür. Bu da oluşmuş biyofilm yapının direncinden ve kararlılığından kaynaklanmaktadır.

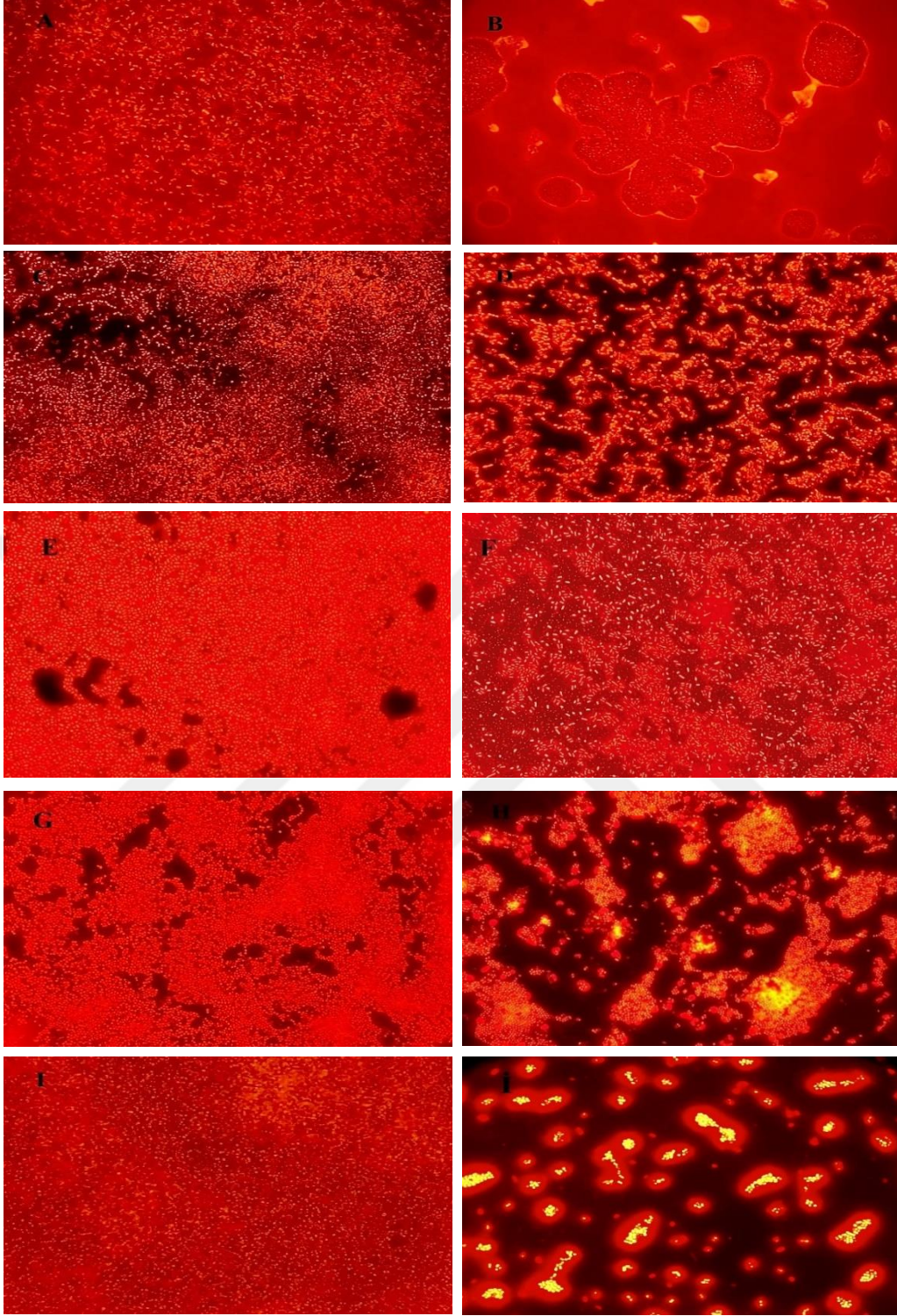
Tablodaki veriler incelendiğinde RuCS27, *P. aeruginosa* PA01 biyofilminin %80, *E. coli* biyofilminin %70, *S. aureus* biyofilminin %60 ve *E. faecalis* biyofilminin %80'den fazlasını parçalamıştır. Diğer test bakterileri olan *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090 ve *Bacillus cereus* ATCC 10976 biyofilmlerine karşı ortalama olarak %30 gibi oldukça düşük bir biyofilm degradasyon aktivitesine ulaşılmıştır.

Biyofilm yaşı-maruz kalma süresi dikkate alındığında ise *P. aeruginosa* bakterisi hariç diğer bakteri türlerinde maruz kalma süresi biyofilmin parçalanmasında daha ön plana çıkmıştır. 24 ve 48 saatlik oluşmuş biyofilmler, 24 saat RuCS27 ile muamele edildiğinde rutenyumun etkisinin arttığı görülürken, *P. aeruginosa* bakterisinde 48 saatlik biyofilimde rutenyumun parçalama aktivitesinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç, *P. aeruginosa* bakterisi biyofilminin daha güçlü olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

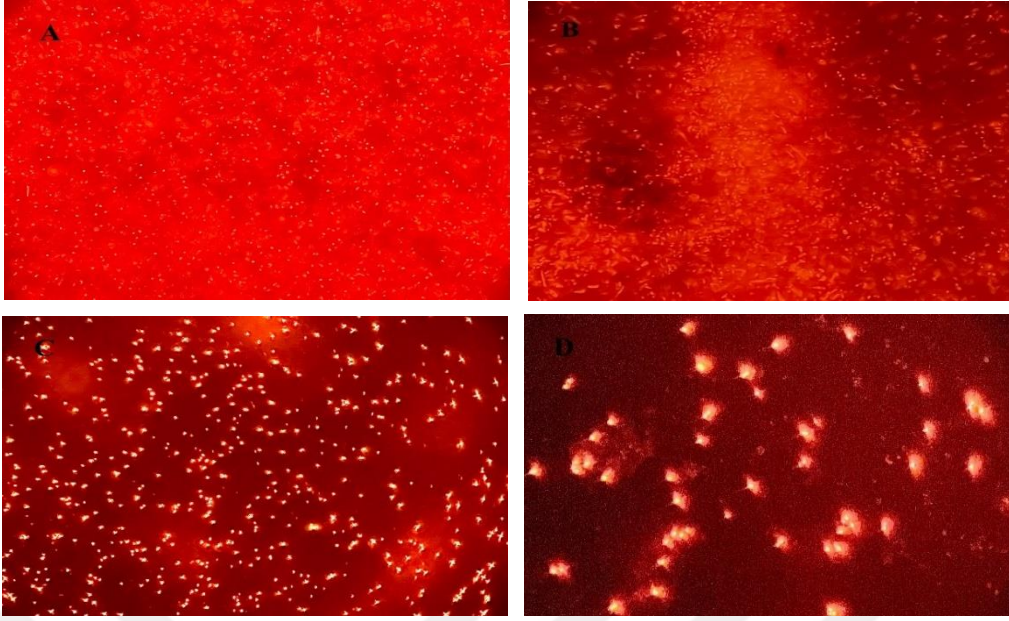
P. aeruginosa biyofilminin parçalanması, birçok araştırmacı tarafından da çalışılmıştır ve birçok araştırmacının üzerinde durduğu bu konu için farklı maddelerin etkileri araştırılmıştır (Reighard ve diğ. 2015, Banar ve diğ. 2019, Blanco-Cabra ve diğ. 2020, Yin ve diğ. 2022). Örneğin, antibiyotiklerle sinerjik etkili olarak alijinat liyaz enzimlerinin degradasyon aktivitesinin *Pseudomonas aeruginosa*'nın olgun biyofilmlerini parçalamak için iyi bir tercih olduğu ileri sürülmüştür (Blanco-Cabra ve diğ. 2020). Benzer şekilde β -glukozidaz enzimlerinin degradasyon aktivitesi yüksek olduğu (Banar ve diğ. 2019), *Pseudomonas* biyofilmini parçalamada antimikrobiyal peptitlerin (AMP) etkinliği (Yin ve diğ. 2022) literatürde gösterilmiştir.

4.3 Mikroskop Analizi

Çalışmanın bu aşamasında RuCS27'nin biyofilm inhibisyon ve biyofilm parçalama aktivitesi doğrulamak amacıyla, rutenyumun etkili olduğu *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 bakterilerinin biyofilm görüntüleri floresan mikroskopta incelenmiştir. Bakterilerin biyofilm yapıları propidyum iyodür (Şekil 4.3) ve DAPI-CTC (Şekil 4.4) ile boyanarak incelenmiştir. Her iki boyamada da bakterilerin kontrole kıyasla RuCS27 ile muamele sonrasında biyofilm yapısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Rutenyum ile muamele edilmemiş kontrol biyofilm yapılarının oldukça yoğun olduğu ve kolonilerin birbiriyile sıkı temas halinde oldukları görülmektedir. Ancak bakteriler RuCS27 ile muamele edildikten sonra hem hücre sayısında gözle görülür bir azalma hem de biyofilmin kontrol gruplarında görülen mimari yapısının bozulduğu görülmektedir. Biyofilm topluluğunun dağınık ve küçük topluluklar şeklinde olması hücreler arasında iletişimin bozulduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, RuCS27'nin antibiyofilm etkisini kanıtlar niteliktedir. Benzer sonuç, Jabłońska-Wawrzycka ve diğ. (2021) tarafından da rapor edilmiş, rutenyum ile muamele edilen *P. aeruginosa* PAO1 bakterisinin biyofilminin morfolojik ve yapısal görüntüsünün hasar gördüğü ve biyofilm yapının mikrokoloniler şeklinde gözlendiği ifade edilmiştir.



Şekil 4.3: Propidyum iyodür (PI) boyaması ile elde edilen Floresan mikroskop görüntüleri. *P. aeruginosa* PAO1 A: Kontrol B: RuCS27 ile muamele edilmiş biyofilm görüntüsü; *E. coli* ATCC 8739 C: Kontrol D: RuCS27 ile muamele edilmiş biyofilm görüntüsü; *L. monocytogenes* NCTC 11994 E: Kontrol F: RuCS27 ile muamele edilmiş biyofilm görüntüsü; *S. aureus* ATCC 25923 G: Kontrol H: RuCS27 ile muamele edilmiş biyofilm görüntüsü; *E. faecalis* ATCC 19433 I: Kontrol İ: RuCS27 ile muamele edilmiş biyofilm görüntüsü



Şekil 4.4: CTC boyaması ile elde edilen *E. coli* ATCC 8739 biyofilminin floresan mikroskop görüntüleri. A: Planktonik kontrol B: RuCS27 ile muamele edilmiş planktonik hücreler C: Biyofilm kontrol D: RuCS27 ile muamele edilmiş biyofilm görüntüsü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bipiridin ligandı içeren rutenyum (RuCS27) bileşiminin farklı bakteriler üzerinde antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria innocua* (6a) ATCC 32090 ve *Bacillus cereus* ATCC 10976 bakterilerine karşı RuCS27 güçlü antibiyofilm etki göstermiş olup rutenyumun bu etkisi floresan mikroskop analizi ile de doğrulanmıştır. RuCS27 bu etkiyi, bakteriyel biyofilm yoğunluğunda azalmaya yol açarak göstermiştir. Diğer bir deyişle, RuCS27, deneylerde kullanılan patojenlerin biyofilm inhibisyonunda ve olgun biyofilmin parçalanmasında önemli derecede etkinlik göstermiştir. Bu etkiye, literatürde rapor edilen çoğu rutenyum kompleksinden daha düşük konsantrasyonda ulaşılmıştır. Bakteriyel biyofilmlerin biyotik ve/veya abiyotik yüzeylerden etkili bir şekilde uzaklaştırılması için RuCS27 potansiyel bir antibiyofilm ajan olabilir. Ancak, konu ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılması gereklidir.

6. KAYNAKLAR

Aird, R. E., Cummings, J., Ritchie, A. A., Muir, M., Morris, R. E., Chen, H., Sadler P.J., Jodrell, D. I., “In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer”, *Br.J. Cancer*, 86 (10), 1652-1657, (2002).

Akao, P. K., Singh, B., Kaur, P., Sor, A., Avni, A., Dhir, A., Verma S., Kapoor S., Phutela U.G., Satpute S., Sharma S., Avisar D., Sandha K.S., Mamane, H., “Coupled microalgal–bacterial biofilm for enhanced wastewater treatment without energy investment”, *J. Water Process Eng.*, 41, 102029, (2021).

Allardyce, C. S., Dyson, P. J. “Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects”, *Platin. Met. Rev.*, 45 (2), 62-69, (2001).

Andrade, A. L., de Vasconcelos, M. A., Arruda, F. V. D. S., do Nascimento Neto, L. G., Carvalho, J. M. D. S., Gondim, A. C. S., de França Lopes, L.G., Silva Sousa, E.H., Teixeira, E. H., “Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria”, *Biofouling*, 36 (4), 442-454, (2020).

Appelt, P., Fagundes, F. D., Facchin, G., Kramer, M. G., Back, D. F., Cunha, M. A., Sandrino, B., Wohnrath, K., de Araujo, M. P., “Ruthenium (II) complexes containing 2-mercaptothiazolates as ligands and evaluation of their antimicrobial activity”, *Inorganica Chim. Acta.*, 436, 152-158, (2015).

Ausbacher, D., Miller, L. A., Goeres, D. M., Stewart, P. S., Strøm, M. B., Fallarero, A., “ α , α -disubstituted β -amino amides eliminate *Staphylococcus aureus* biofilms by membrane disruption and biomass removal”, *Biofilm*, 6, 100151, (2023).

Banar, M., Emaneini, M., Beigverdi, R., Fanaei Pirlar, R., Node Farahani, N., van Leeuwen, W. B., Jabalameli, F., “The efficacy of lyticase and β -glucosidase enzymes on biofilm degradation of *Pseudomonas aeruginosa* strains with different gene profiles”, *BMC Microbiol.*, 19, 1-10, (2019).

Benjamin Garbutcheon-Singh, K., P Grant, M., W Harper, B., M Krause-Heuer, A., Manohar, M., Orkey, N., R Aldrich-Wright, J., “Transition metal based anticancer drugs”, *Curr. Top. Med. Chem.*, 11(5), 521-542, (2011).

Bennett, A. N., Woolard, K. J., Sorge, A., Melander, C., Gunn, J. S., “Spectrum of activity of Salmonella anti-biofilm compounds: Evaluation of activity against biofilm-forming ESKAPE pathogens”, *Biofilm*, 6, 100158, (2023).

Bi, Y., Xia, G., Shi, C., Wan, J., Liu, L., Chen, Y., Wu, Y., Zhang, W., Zhou, M., He, H., Liu, R., “Therapeutic strategies against bacterial biofilms”, *Fundam. Res.*, 1 (2), 193-212, (2021).

Biegański, P., Szczupak, Ł., Arruebo, M., Kowalski, K., “Brief survey on organometalated antibacterial drugs and metal-based materials with antibacterial activity”, *RSC Chem. Biol.*, 2(2), 368-386, (2021).

Binjawhar, D. N., Alfaifi, M. Y., El Hamd, M. A., Shati, A. A., Elbehairi, S. E. I., Fayad, E., Zein, M.A., Elshaaawy, R.M., Hassan, Y. A., “Upgrading the antibacterial and antibiofilm potential of nanoruthenium via encapsulation by thiazolium ionic liquids-functionalized chitosan film”, *Eur. Polym. J.*, 207, 112822, (2024).

Blanco-Cabra, N., Paetzold, B., Ferrar, T., Mazzolini, R., Torrents, E., Serrano, L., LLuch-Senar, M., “Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, *Sci. Rep.*, 10(1), 9390, (2020).

Bolhuis, A., Hand, L., Marshall, J. E., Richards, A. D., Rodger, A., Aldrich-Wright, J., “Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 42 (4), 313-317, (2011).

Brabec, V., Kasparkova, J., “Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents”, *Coord. Chem. Rev.*, 376, 75-94, (2018).

Bu, S., Jiang, G., Jiang, G., Liu, J., Lin, X., Shen, J., Xiong, Y., Duan, X., Liao, X., “Antibacterial activity of ruthenium polypyridyl complexes against *Staphylococcus aureus* and biofilms”, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 25, 747-757, (2020).

ChunYan, Z., RuJian, Y., LiQiang, W., HaiYan, H., JinTao, W., XiangWen, L., XueMin, D., YanShi, X., “Design, synthesis, and evaluation of aryl-thioether ruthenium polypyridine complexes: A multi-target antimicrobial agents against Gram-positive bacteria”, *Eur. J. Med. Chem.*, 240, 114562, (2022).

Claessen, D., Errington, J., “Cell wall deficiency as a coping strategy for stress”, *Trends Microbiol.*, 27(12), 1025-1033, (2019).

Conti, L., Mengoni, A., Giacomazzo, G. E., Mari, L., Perfetti, M., Fagorzi, C., Sorace, L., Valtancoli, B., Giorgi, C., “Exploring the potential of highly charged Ru (II)-and heteronuclear Ru (II)/Cu (II)-polypyridyl complexes as antimicrobial agents”, *J. Inorg. Biochem.*, 220, 111467, (2021).

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M., “Microbial biofilms”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 711-745. (1995).

Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., Alvarez-Ordóñez, A., “New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry”, *Front. microbiol.*, 7, 1641, (2016).

Crabbé, A., Jensen, P. Ø., Bjarnsholt, T., Coenye, T., “Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms”, *Trends Microbiol.*, 27(10), 850-863, (2019).

Czerwonka, G., Gmitter, D., Guzy, A., Rogala, P., Jabłońska-Wawrzycka, A., Borkowski, A., Cłapa, T., Narożna, D., Kowalczyk, P., Syczewski, M., Drabik, M., Dańczuk, M., Kaca, W. A., “A benzimidazole-based ruthenium (IV) complex inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by interacting with siderophores and the cell envelope, and inducing oxidative stress”, *Biofouling*, 35, 59–74, (2019).

D’Amato, A., Mariconda, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., Catalano, A., Sinicropi, M. S., Longo, P., “Complexes of Ruthenium (II) as Promising Dual-Active Agents against Cancer and Viral Infections”, *Pharm.*, 16(12), 1729, (2023).

de Almeida Campos, L. A., de Oliveira Santos, J. V., Cavalcanti, I. D. L., Neto, A. F. S., Nogueira, M. C. D. B. L., Santos-Magalhães, N. S., Cavalcanti, I. M. F., “Natural products and combination therapy as strategies against bacterial biofilm”, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 77, 163-186, (2023).

de Sousa, A. P., Gondim, A.C.S., Sousa, E. H.S., de Vasconcelos, M. A., Teixeira, E. H., Bezerra, B. P., Ayala, A.P., Martins, P.H.R., de França Lopes, L.G., Holanda, A. K.M., “An unusual bidentate methionine ruthenium (II) complex: photo-uncaging and antimicrobial activity”, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 25, 419-428, (2020).

Deng, W., Zhang, C. Y., Dou, L. X., Huang, L. T., Wang, J. T., Liao, X. W., Wang, L.P., Yu, R.J., Xiong, Y. S., “Polypyridyl ruthenium complexes with benzothiazole moiety as membrane disruptors and anti-resistance agents for *Staphylococcus aureus*”, *J. Inorg. Biochem.*, 254, 112517, (2024).

Devi, C. S., Kumar, D. A., Singh, S. S., Gabra, N., Deepika, N., Kumar, Y. P., Satyanarayana, S., “Synthesis, interaction with DNA, cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic inducing properties of ruthenium (II) molecular “light switch” Complexes”, *Eur. J. Med. Chem.*, 64, 410-421, (2013).

Donlan, R. M., Costerton, J. W., “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2), 167-193, (2002).

Dragutan, I., Dragutan, V., Demonceau, A., “Editorial of special issue ruthenium complex: The expanding chemistry of the ruthenium complexes” *Molecules*, 20(9), 17244-17274, (2015).

Evans, A., Kavanagh, K. A., “Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens”, *J. Med. Microbiol.*, 70 (5), 001363, (2021).

Feng, J., Yee, R., Zhang, S., Tian, L., Shi, W., Zhang, W. H., Zhang, Y., “A rapid growth-independent antibiotic resistance detection test by SYBR green/propidium iodide viability assay”, *Front. Med.*, 5, 127, (2018).

Frei, A., Zuegg, J., Elliott, A. G., Baker, M., Braese, S., Brown, C., Chen, F., Dowson, C.G., Dujardin, G., Jung, N., King, A.P., Mansour, A.M., Massi, M., Moat, J.,

Mohamed, H.A., Renfrew, A.K., Rutledge, P.J., Sadler, P.J., Todd, M.H., Willans, C.E., Wilson, J.J., Cooper, M.A., Blaskovich, M. A., “Metal complexes as a promising source for new antibiotics”, *Chem. Sci.*, 11(10), 2627-2639, (2020).

Gao, S., Shen, Y., Yuan, S., Quan, Y., Li, X., Wang, Y., Yi, L., Wang, Y., “Methyl anthranilate deteriorates biofilm structure of *Streptococcus suis* and antagonizes the capsular polysaccharide defence effect”, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 62 (6), 106996, (2023).

Ghosh, S., “Cisplatin: The first metal based anticancer drug”, *Bioorg. Chem*, 88, 102925, (2019).

Ghosh, S., Amariei, G., Mosquera, M. E. G., Rosal, R., “Polymeric ruthenium precursor as a photoactivated antimicrobial agent”, *J. Hazard. Mater.*, 402, 123788, (2021).

Grubbs H.R., “Ruthenium”, *Chem. Eng. News.*, 3(36):112–113, (2003).

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P., “Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(2), 95-108, (2004).

Hall- Stoodley, L., Stoodley, P., “Evolving concepts in biofilm infections”, *Cell. Microbiol.*, 11(7), 1034-1043, (2009).

Hassan, R. M., Abd El-Maksoud, M. S., Ghannam, I. A.Y., El-Azzouny, A. A. S., Aboul-Enein, M. N., “Synthetic non-toxic anti-biofilm agents as a strategy in combating bacterial resistance”, *Eur. J. Med. Chem.*, 115867, (2023).

Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O., Song, Z., Høiby, N., “Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, *Antimicrob. Agents Chemother*, 55(9), 4469-4474, (2011).

Høiby, N., “Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis”, *BMC Med*, 9,32, (2011).

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., “Antibiotic resistance of bacterial biofilms”, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35(4), 322-332, (2010).

Huang, H. Y., Wang, Q., Zhang, C. Y., Chen, Z. X., Wang, J. T., Liao, X. W., Yu, R.J., Xiong, Y. S., “Synthesis and biological evaluation of ruthenium complexes containing phenylseleny against Gram-positive bacterial infection by damage membrane integrity and avoid drug-resistance”, *J. Inorg. Biochem.*, 242, 112175, (2023).

Hussaini, I. M., Oyewole, O. A., Sulaiman, M. A., Dabban, A. I., Sulaiman, A. N., Tarek, R., “Microbial anti-biofilms: types and mechanism of action”, *Res. Microbiol*, 175 (3),104111, (2023).

Jabłońska-Wawrzycka, A., Rogala, P., Czerwonka, G., Gałczyńska, K., Drabik, M., Dańczuk, M., “Ruthenium Complexes with 2-Pyridin-2-yl-1 H-benzimidazole as Potential Antimicrobial Agents: Correlation between Chemical Properties and Anti-Biofilm Effects”. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (18), 10113, (2021).

Jabłońska-Wawrzycka, A., Rogala, P., Czerwonka, G., Michałkiewicz, S., Hodorowicz, M., Kowalczyk, P., “Ruthenium (IV) complexes as potential inhibitors of bacterial biofilm formation”, *Molecules*, 25 (21), 4938, (2020).

Kaushal, R., Kaur, M., Sharma, J., Nehra, K., “Antibacterial and ct-DNA binding studies of new synthesized ruthenium (III) hydroxamate complexes: Design, synthesis, DFT calculations and in-vitro study”, *J. Mol. Struct.*, 1295 (2), 136788, (2024).

Khan, M., Khan, M. S. A., Borah, K. K., Goswami, Y., Hakeem, K. R., Chakrabarty, I., “The potential exposure and hazards of metal-based nanoparticles on plants and environment, with special emphasis on ZnO NPs, TiO₂ NPs, and AgNPs: a review”, *Environmental Advances*, 6, 100128, (2021).

Khan, S. A., Saleem, K., Khan, Z., “Synthesis, characterization and in vitro antibacterial activity of new steroidal thiazolo quinoxalines”, *Eur. J. Med. Chem.*, 42(1), 103-108, (2007).

Khelissa, S., El Fannassi, Y., Mechmechani, S., Alhuthali, S., El Amrani, M. A., Gharsallaoui, A., Barras, A., Chihib, N. E., “Water-soluble ruthenium (II) complex derived from optically pure limonene and its microencapsulation are efficient tools against bacterial food pathogen biofilms: Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, and Listeria monocytogenes”, *Front. microbiol.*, 12, 711326, (2021)

Kilincarslan, S. D., Sahin, C., Mutlu, D., Nasirli, F., Arslan, S., Dogan, N. M., “Synthesis, Characterization, Antibiofilm and Anticancer Activity of New Ruthenium Complexes with 2, 2'-bipyridine-4, 4'-dicarboxamide”, *Lett. Org. Chem.*, 19(11), 1013-1022, (2022).

Kumarasamy, K., Devendhiran, T., Asokan, S. M., Mahendran, R., Lin, M. C., Chien, W. J., Ramasamy, S.K., Huang, C. Y., “Synthesis and structural characterization of C, N-benzimidazole based ruthenium (II) complex with in vitro anticancer activity”, *Inorg. Chem. Commun.*, 152, 110662, (2023).

Lam, P. L., Lu, G. L., Hon, K. M., Lee, K. W., Ho, C. L., Wang, X., Tang, J.C.O., Lam, K.H., Wong, R.S.M., Kok, S.H.L., Bian, Z.X., Li, H., Lee, K.K.H., Gambari, R., Chui, C.H., Wong, W. Y., “Development of ruthenium (II) complexes as topical antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”, *Dalton Trans.*, 43(10), 3949-3957, (2014).

Lee, J. H., Kim, Y. G., Cho, M. H., Kim, J. A., Lee, J., “7-fluoroindole as an antivirulence compound against *Pseudomonas aeruginosa*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 329 (1), 36-44, (2012).

Lee, S. Y., Kim, C. Y., Nam, T. G., “Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives”, *Drug. Des. Devel. Ther.*, 5375-5392, (2020).

Levina, A., Mitra, A., Lay, P. A., “Recent developments in ruthenium anticancer drugs”, *Metallomics*, 1(6), 458-470, (2009).

Lewis, K., “Riddle of biofilm resistance”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(4), 999-1007, (2001).

Liu, X., Sun, B., Kell, R. E.M, Southam, H. M., Butler, J. A., Li, X., Poole, R.K., Keene F.R., Collins, J. G., “The antimicrobial activity of mononuclear ruthenium (II) complexes containing the dppz ligand”, *ChemPlusChem*, 83(7), 643-650, (2018).

Lucaciu, R. L., Hangan, A. C., Sevastre, B., Oprean, L. S., “Metallo-drugs in cancer therapy: Past, present and future”, *Molecules*, 27(19), 6485, (2022).

Ma, D. L., He, H. Z., Leung, K. H., Chan, D. S. H., Leung, C. H., “Bioactive luminescent transition- metal complexes for biomedical applications”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52(30), 7666-7682, (2013).

Mai, W., Chen, J., Liu, H., Liang, J., Tang, J., Wei, Y., “Advances in studies on microbiota involved in nitrogen removal processes and their applications in wastewater treatment”, *Front. Microbiol.*, 12, 746293, (2021).

Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I., Crisponi, G., Zoroddu, M. A., “Noble metals in medicine: Latest advances”, *Coord. Chem. Rev.*, 284, 329-350, (2015).

Munteanu, A. C., Uivarosi, V., “Ruthenium complexes in the fight against pathogenic microorganisms. an extensive review”, *Pharm.*, 13(6), 874, (2021).

Nadar, S., Khan, T., Patching, S. G., Omri, A., “Development of antibiofilm therapeutics strategies to overcome antimicrobial drug resistance”, *Microb.*, 10 (2), 303, (2022).

Nolan, V. C., Rafols, L., Harrison, J., Soldevila-Barreda, J. J., Crosatti, M., Garton, N. J., Wegrzyn, M., Timms, D.L., Seaton, C.C., Sendron, H., Azmanova, M., Barry, N.P.E., Barry, A.P., Cox, J. A., “Indole-containing arene-ruthenium complexes with broad spectrum activity against antibiotic-resistant bacteria”, *Curr. Res. Microb. Sci.*, 3, 100099, (2022).

Oner, I., Sahin, C., Varlikli, C., “Electroluminescence from two new ruthenium (II) complexes as phosphorescent dopant: Positive effect of swallow-tail bipyridyl ligand”, *Dyes Pigm.*, 95(1), 23-32, (2012).

Rather, M. A., Gupta, K., Mandal, M., “Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies”, *Braz. J. Microbiol.*, 52, 1701-1718, (2021).

Reighard, K. P., Hill, D. B., Dixon, G. A., Worley, B. V., Schoenfisch, M. H., “Disruption and eradication of *P. aeruginosa* biofilms using nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides”, *Biofoul.*, 31(9-10), 775-787, (2015).

Reygaert, W. C., “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria”, *AIMS microbiology*, 4(3), 482-501, (2018).

Rogala, P., Czerwonka, G., Michałkiewicz, S., Hodorowicz, M., Barszcz, B., Jabłońska- Wawrzycka, A., “Synthesis, structural characterization and antimicrobial evaluation of ruthenium complexes with heteroaromatic carboxylic acids”, *Chem. Biodivers.*, 16(11), e1900403, (2019).

Rumbaugh, K. P., Sauer, K., “Biofilm dispersion”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 18(10), 571-586, (2020).

Sahin, C., Dittrich, T., Varlikli, C., Icli, S., Lux-Steiner, M. C. “Role of side groups in pyridine and bipyridine ruthenium dye complexes for modulated surface photovoltage in nanoporous TiO₂”, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells.*, 94(4), 686-690, (2010).

Sahin, C., Mutlu, D., Nasirli, F., Mahmoudi, G., Zubkov, F. I., Arslan, S., Dogan, N. M., “New iridium bis- terpyridine complexes: synthesis, characterization, antibiofilm and anticancer potentials”, *Biomet.*, 34(3), 701-713, (2021).

Sales, D. K.S, Simplicio, L. M.T, da Silva, C. D.S, Enju, C.M.B., Silva, V. B., Paulo, T. D. F., Santos, I.P., Quadros, H.C., Meira, C.S., Soares, M.B.P., de F.Lopes, L.G., de Sousa, E.H.S., de Sa, D. S., “A bis-indazolic ruthenium (II) complex: Reactivity and biological studies on cancer cells”, *Inorg. Chim. Acta.*, 516, 120125, (2021).

Sambanthamoorthy, K., Gokhale, A. A., Lao, W., Parashar, V., Neiditch, M. B., Semmelhack, M. F., Lee, I., Waters, C. M., “Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(9), 4369-4378, (2011).

Scalese, G., Kostenkova, K., Crans, D. C., Gambino, D., “Metalloomics and other omics approaches in antiparasitic metal-based drug research”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 67, 102127, (2022).

Schilcher, K., Horswill, A. R., “Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 84(3), 10-1128, (2020).

Serra, D. O., Hengge, R., “Stress responses go three dimensional—the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms”, *Environ. Microbiol.*, 16(6), 1455-1471, (2014).

Sharma, B., Shukla, S., Rattan, R., Fatima, M., Goel, M., Bhat, M., Dutta, S., Ranjan, R.K., Sharma, M., “Antimicrobial agents based on metal complexes: Present situation and future prospects”, *Int. J. Biomater.*, 2022(1), 6819080, (2022).

Singh, A., Barman, P., “Recent advances in Schiff base ruthenium metal complexes: synthesis and applications”, *Top. Curr. Chem.*, 379 (29), 1-71, (2021).

Sonawane, J. M., Rai, A. K., Sharma, M., Tripathi, M., Prasad, R., “Microbial biofilms: Recent advances and progress in environmental bioremediation”, *Sci. Total Environ.*, 824, 153843, (2022).

Song, D., Jia, A., Qi, X., Dong, K., Liu, S., Man, C., Yang, X., Jiang, Y., “Co-culture of *Cronobacter sakazakii* and *Staphylococcus aureus*: Explore the influence of mixed biofilm formation and regulation of *Cronobacter sakazakii* biofilm formation genes”, *Food Res. Int.*, 173 (2), 113457, (2023).

Southam, H. M., Butler, J. A., Chapman, J. A., Poole, R. K., “The microbiology of ruthenium complexes”, *Adv. Microb. Physiol.*, 71, 1-96, (2017)

Tan, C., Liu, J., Chen, L., Shi, S., Ji, L., “Synthesis, structural characteristics, DNA binding properties and cytotoxicity studies of a series of Ru (III) Complexes”, *J. Inorg. Biochem.*, 102(8), 1644-1653, (2008).

Tarallo, M. B., Urquiola, C., Monge, A., Costa, B. P., Ribeiro, R. R., Costa-Filho, A. J., Mercader, R.C., Pavan, F.R., Leite, C.Q.F., Torre, M.H., Gambino, D., “Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis”, *J. Inorg. Biochem.*, 104(11), 1164-1170, (2010).

Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering R. C., Ferraro, M. J., “Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*”, *Lancet.*, 358(9277), 207-208, (2001).

Vázquez-Armenta, F.J., Beltrán-Torres, M., Ayala-Zavala, J.F., Velázquez-Contreras, E.F., Rocha-Alonzo, F., González-Aguilar, G.A., Sugich-Miranda, R., “Antibiofilm properties of copper (II) and iron (III) complexes with an EDTA-based phenylene macrocycle and its acyclic analogue against food and clinical related pathogens”, *Polyhedr.*, 198, 115076, (2021).

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L. L., “Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease”, *Antibiot.*, 9(2), 59, (2020).

Wang, L., Huang, B., Duan, X., Jiang, G., Xiong, Y., Zhong, S., Wang, J., Liao, X., “The development of three ruthenium-based antimicrobial metallodrugs: Design, synthesis, and activity evaluation against *Staphylococcus aureus*”, *J. Chem. Res.*, 45(11-12), 1059-1067, (2021).

Wang, L., Liu, L., Wang, X., Tan, Y., Duan, X., Zhang, C., Cheng, J., Xiong, Y., Jiang, G., Wang, J., Liao, X., “Ruthenium (II) complexes targeting membrane as biofilm disruptors and resistance breakers in *Staphylococcus aureus* bacteria”, *Eur. J. Med. Chem.*, 238, 114485, (2022).

Yang, Y., Liao, G., Fu, C., “Recent advances on octahedral polypyridyl ruthenium (II) complexes as antimicrobial agents”, *Polym.*, 10(6), 650, (2018).

Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P., Lin, J., “Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies”, *Front. Microbiol.*, 13, 955286, (2022).

