



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN *BACILLUS CEREUS*
BIYOFİLMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ VE ANTİBAKTERİYEL
ÖZELLİKLERİ

DENÇA TOKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER

İSTANBUL, 2024



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN *BACILLUS CEREUS*
BİYOFİLMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ VE ANTİBAKTERİYEL
ÖZELLİKLERİ

DENÇA TOKER

520121005

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER

İSTANBUL, 2024

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince tecrübelerini ve bilgilerini benden esirgemeyen ve ne zaman yardıma ihtiyacım olsa her zaman bana yardımcı olan danışmanım, Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde bana laboratuvarının kapılarını açan ve çalışma olanağı sağlayan, bilgisiyle ve yenilikçi fikirleriyle her zaman ufkumu genişleten ve çalışmalarımda bana destek olan Prof. Dr. Nüzhet Cenk SESAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatta her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim, akıl danıştığım, bana yol gösteren ve yanımda olan Doç. Dr. Didem BERBER'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Barış GÖKALSIN'a ve tez çalışmalarımda kullandığım bitkileri toplamak için bizimle araziye gelen ve bitkilerin teşhisini gerçekleştiren Arş. Gör. Ahmet YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimden bugünlere gelmemi sağlayan ve bana yol gösteren bütün Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli öğretim görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatımda her zaman desteklerini hissettiğim, beni hiç yalnız bırakmayan, deneylerimde ve tez aşamamda bana yardım eden canım arkadaşlarım Beste ŞENER, Merve KIZAKLI YILDIRIM, Orçun TOKSÖZ, Tunahan Irmak BAŞARAN, Gamze KURTULUŞ ve diğer bütün SesalLAB ekibine çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda yanımda olduklarını ve olacaklarını bildiğim, beni her konuda destekleyen ve bu günlere gelmemde emekleri çok olan ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan birtanecik annem Vilma TOKER'e, canım babam Mesud TOKER'e ve canım kardeşim Arden TOKER'e; ailemizin bebeği, benim neşe kaynağım olan ve beni koşulsuz seven canım oğlum Murphy'e, sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını FYL-2022-10792 no'lu proje ile destekleyen BAPKO'ya ve 2210 Yurt İçi Yüksek Lisans burs programı ile destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür ederim.

HAZİRAN 2024

Dença TOKER

İÇİNDEKİLER	SAYFA
TEŞEKKÜRLER	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER	vii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilm Oluşum Basamakları Ve Yapısı	4
1.2. <i>Bacillus cereus</i> Sistematığı ve Genel Özellikleri	6
1.2.1. <i>B. cereus</i> Sistematığı	6
1.2.2 Karakteristik Özellikleri ve Morfolojisi	6
1.2.3. <i>B. cereus</i> Biyofilm Yapısı ve Etkileri	7
1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Bitkilerin Sistematığı ve Özellikleri	9
1.3.1. <i>Centaurea kilaea</i> ve <i>Centaurea hermannii</i> Sistematığı ve Özellikleri	9
1.3.2. <i>Lophiolepis byzantina</i> Sistematığı ve Özellikleri	10
1.3.3. <i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i> Sistematığı ve Özellikleri	11
1.3.4. <i>Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae</i> Sistematığı ve Özellikleri	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1. Materyal	14
2.1.1. Bakteri Suşu	14
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler Ve Kimyasallar	14
2.1.3. Kullanılan Cihazların Listesi	15
2.1.4. Besiyerlerinin Hazırlanması ve Kullanım Amaçları	16
2.1.4.1. Tryptic Soy Broth Besiyeri	17
2.1.4.2. Mueller Hinton Broth Besiyeri	17
2.1.4.3. Tryptic Soy Agar Besiyeri	18
2.1.4.4. Mueller Hinton Agar Besiyeri	18

2.1.4.5.Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar Katı Besiyeri (<i>B.cereus</i> Selektif Besiyeri)	19
2.2. Yöntem	20
2.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması	20
2.2.2. Bitki Özütlerinin Eldesi	20
2.2.3. Bakterinin Temin Edilmesi, Çoğaltılması ve Saklanması	22
2.2.4. Bitkilerin Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi	22
2.2.5. Bitki Özütlerinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi	23
2.2.6. Disk Difüzyon Yöntemi ile Bitki Özütlerinin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi	24
2.2.7. Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Biyofilm İnhibisyonunun Belirlenmesi	25
2.2.8. İstatistiksel Analizler	26
3. BULGULAR	27
3.1. Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri	27
3.1.1. <i>B. cereus</i> Suşuna Uygulanacak Antibakteriyel Deneylerde Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Kanamisin Antibiyotığının Antibakteriyel Etkinliği	27
3.1.2. <i>Centaurea kilaia</i> Bitki Özütlerinin <i>B. Cereus</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri	28
3.1.3. <i>Centaurea hermannii</i> Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri	30
3.1.4. <i>Lophiolepis byzantina</i> Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri	32
3.1.5. <i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i> Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri	34
3.1.6. <i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i> Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri	35
3.2. Bitki Özütlerinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	37
3.3. Bitki Özütlerinin Disk Difüzyon Yöntemi İle İnhibisyon Zonlarının Belirlenmesi	38
3.4. Bitki Özütlerinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Biyofilm İnhibisyonunun Belirlenmesi	39

3.4.1. <i>Centaurea kilaia</i> Bitki Özütlerrinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri	40
3.4.2. <i>Centaurea hermannii</i> Bitki Özütlerrinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri	41
3.4.3. <i>Lophiolepis byzantina</i> Bitki Özütlerrinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri	43
3.4.4. <i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i> Bitki Özütlerrinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri	45
3.4.5. <i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i> Bitki Özütlerrinin <i>B. cereus</i> Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri	46
4. TARTIŖMA	48
5. SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR	56
EKLER	68
ÖZGEÇMİŖ	71

ÖZET

TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN *BACILLUS CEREUS* BİYOFİLMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ

Bakterilerin adaptasyonunda ve hayatta kalmasında önemli rol oynayan biyofilm yapısı, canlı dokular dışında birçok yüzeyde oluşabilmekte ve insan sağlığı üzerinde kalıcı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Biyofilm oluşturan bakteriler özellikle gıda endüstrisinde ve klinik ortamlarda olumsuz etkilere ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Gıda işleme sistemlerinde meydana gelen biyofilm gıdaların bozulmasına yol açabilmekte ve tüketici sağlığı için tehdit oluşturabilmektedir. Gıda endüstrisinde biyofilm yapılarının ortadan kaldırılması için genellikle kimyasal temizlik maddeleri ve dezenfektanlar kullanılmaktadır. Bu kimyasalların düzenli olarak kullanılması, insan sağlığı için zararlı olduğundan, bitkisel materyaller başta olmak üzere doğal içerikli hammadde arayışı artmıştır. Bu bağlamda küresel gıda zehirlenmesi salgınlığının en yaygın nedenlerinden olan *Bacillus cereus* bakterisi biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmasından dolayı gıda endüstrisinde ekonomik kayıplara ve dolayısı ile insan sağlığı üzerinde ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, *B. cereus* bakterisinin neden olduğu biyofilm kontaminasyonu ile başa çıkabilmek için doğal içerikli ürünlerin tespiti önem taşımaktadır.

Bu bilgiler ışığında, tez çalışması kapsamında Türkiye'ye endemik olan ve potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülen, *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata subsp. lyrata* ve *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* bitkilerine ait metanol ve etil asetat özütlerinin, *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlikleri belirlenmiştir. *C. kilaea*, *C. hermannii* ve *E. amygdaloides subsp. robbiae* bitki özütlerinin *B. cereus* üzerinde en yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu, *C. lyrata subsp. lyrata* bitkisinin metanol özütü hariç diğer bütün bitki özütlerinin ise *B. cereus* biyofilm formunda %40'ın üzerinde inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, tez çalışmasında kullanılan endemik bitkilerin gıda sektöründeki *B. cereus* kontaminasyonları için potansiyel bir antibakteriyel ve antibiyofilm kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

ABSTRACT

EFFECTS OF SOME ENDEMIC PLANTS GROWING IN TURKEY ON *BACILLUS CEREUS* BIOFILM AND THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES

The biofilm structure, which plays an important role in the adaptation and survival of bacteria, can form on many surfaces other than living tissues and cause permanent infections on human health. Biofilm-forming bacteria cause negative effects and economic losses, especially in the food industry and clinical settings. Biofilms formed in food processing systems can cause food spoilage and pose a threat to consumer health. Chemical cleaning agents and disinfectants are generally used to remove biofilm structures in the food industry. Given the potential harm to human health associated with the regular use of chemical cleaning agents and disinfectants, there has been a concomitant increase in the search for natural raw materials, especially plant materials. In this context, *Bacillus cereus* bacteria, which is one of the most common causes of global food poisoning outbreaks, causes economic losses in the food industry and thus serious problems on human health due to its biofilm-forming ability. With this information, it is important to identify products with natural ingredients to cope with biofilm contamination caused by *B. cereus* bacteria.

In light of the aforementioned information, the antibacterial and antibiofilm activities of methanol and ethyl acetate extracts of *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* and *Euphorbia amygdaloides* subsp. *robbiae*, which are endemic to Turkey and thought to be a potential source, were determined within the scope of this thesis. It was established that the plant extracts of *C. kilaea*, *C. hermannii* and *E. amygdaloides* subsp. *robbiae* exhibited the highest antibacterial activity against *B. cereus*. Furthermore, all plant extracts, with the exception of the methanol extract of *C. lyrata* subsp. *lyrata*, demonstrated more than 40% inhibition against *B. cereus* biofilm formation. In light of the aforementioned findings, it is postulated that the endemic plants utilised in the thesis study may represent a potential source of antibacterial and antibiofilm agents for the control of *B. cereus* contamination in the food sector.

SEMBOLLER / SYMBOLS

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
ml	: Mililitre
L	: Litre
mg	: Miligram
g	: Gram
nm	: Nanometre
mm	: Milimetre
µl	: Mikrolitre
µg:	: Mikrogram
NaCl	: Sodyum Klorür

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

CV	: Kristal Viyole
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECDC	: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
eDNA	: Ekstraselüler DNA
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPS	: Eksopolimerik Yapılar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Phosphate Buffer Saline
QS	: Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama)
w/v	: ağırlık/hacim

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi	5
Şekil 1.2.	EPS matriksinin bileşimi ve ana bileşenlerin işlevleri	6
Şekil 1.3.	<i>B. cereus</i> 'un elektron mikroskop görüntüsü	6
Şekil 1.4.	<i>C. kilaia</i> bitkisi genel görünümü	9
Şekil 1.5.	<i>C. hermannii</i> bitkisi genel görünümü	9
Şekil 1.6.	<i>L. byzantina</i> bitkisi genel görünümü	11
Şekil 1.7.	<i>C. lyrata subsp. lyrata</i> bitkisi genel görünümü	12
Şekil 1.8.	<i>E. amygdaloides subsp. robbiae</i> bitkisi genel görünümü	13
Şekil 2.1.	Bitkilerden özüt eldesi aşamalarının şematik gösterimi	21
Şekil 2.2.	Bitki özütlerinin eldesi	21
Şekil 2.3.	Bitki özütlerinin antibakteriyel etkinliklerinin ve minimum inhibitör konsantrasyonun belirlenmesi aşamalarının şematik gösterimi.	24
Şekil 2.4.	Disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi	25
Şekil 2.5.	Boyanan biyofilm plakası ve mutimod plaka okuyucu genel görünümü	26
Şekil 3.1.	Kanamisin antibiyotiğinin farklı konsantrasyonlarının <i>B. cereus</i> üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.	27
Şekil 3.2.	<i>Centaurea kilaia</i> metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının <i>B. cereus</i> üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.	28
Şekil 3.3.	<i>Centaurea kilaia</i> etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının <i>B. cereus</i> üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.	29
Şekil 3.4.	<i>Centaurea hermannii</i> metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının <i>B. cereus</i> üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.	30

- Şekil 3.5** *Centaurea hermannii* etil asetat özütünün farklı 31 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.6** *Lophiolepis byzantina* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının 32 *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.7** *Lophiolepis byzantina* etil asetat özütünün farklı 33 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.8** *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* metanol özütünün farklı 34 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.9** *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* etil asetat özütünün farklı 34 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.10** *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *robbiae* metanol özütünün farklı 36 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.11** *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *robbiae* etil asetat özütünün 36 farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.
- Şekil 3.12** *Centaurea kilaea* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. 40 cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.13** *Centaurea kilaea* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. 40 cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.14** *Centaurea hermannii* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının 42 *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.15** *Centaurea hermannii* etil asetat özütünün farklı 42 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.16** *Lophiolepis byzantina* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının 43 *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.

- Şekil 3.17** *Lophiolepis byzantina* etil asetat özütünün farklı 44 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.18** *Campanula lyrata subsp. lyrata* metanol özütünün farklı 45 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.19** *Campanula lyrata subsp. lyrata* etil asetat özütünün farklı 45 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.20** *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* metanol özütünün farklı 46 konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.
- Şekil 3.21** *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* etil asetat özütünün 47 farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.

TABLO LİSTESİ**SAYFA**

Tablo 2.1.	Kullanılan besiyerlerinin kullanım amaçları	16
Tablo 2.2.	Tryptic Soy Broth sıvı besiyerinin hazırlanması	17
Tablo 2.3.	Mueller Hinton Broth sıvı besiyerinin hazırlanması	17
Tablo 2.4.	Tryptic Soy Agar katı besiyerinin hazırlanması	18
Tablo 2.5.	Mueller Hinton Agar katı besiyerinin hazırlanması	18
Tablo 2.6.	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar katı besiyerinin hazırlanması	19
Tablo 2.7.	Antibakteriyel deneylerde kullanılan bitkilerin stok ve uygulanan konsantrasyonları	23
Tablo 3.1.	Kanamisin <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri	28
Tablo 3.2.	<i>Centaurea kilaia</i> özütlerinin <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri	29
Tablo 3.3.	<i>Centaurea hermannii</i> <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri	31
Tablo 3.4.	<i>Lophiolepis byzantina</i> özütlerinin <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.	33
Tablo 3.5.	<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i> özütlerinin <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri	35
Tablo 3.6.	<i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i> özütlerinin <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri	37
Tablo 3.7.	Bitki özütlerinin <i>B. cereus</i> üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyonu	38
Tablo 3.8.	Bitki özütlerinin inhibisyon zonları	39
Tablo 3.9.	<i>Centaurea kilaia</i> özütlerinin <i>B. cereus</i> 'a uygulanan konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri	41

- Tablo 3.10.** *Centaurea hermannii* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan 42 konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri
- Tablo 3.11.** *Lophiolepis byzantina* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan 44 konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri
- Tablo 3.12.** *Campanula lyrata subsp. lyrata* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan 46 konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri
- Tablo 3.13.** *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* özütlerinin *B. cereus*'a 47 uygulanan konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri.



1. GİRİŞ

Bakterilerin doğada iki farklı yaşam formuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu yaşam formlarından ilki bakterilerin tek, bağımsız, serbestçe yüzen planktonik hücreler olarak yaşamlarını sürdürdükleri ve ikincisi ise, biyofilm adı verilen ve bakterilerin mikrobiyal kümeler oluşturarak yaşamlarını sürdürdükleri formdur. (Sauer ve ark., 2022). Biyofilm, bakterilerin canlı veya cansız bir yüzeye ve birbirlerine tutunması, sonrasında da çoğalmalarıyla oluşturdukları mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanmaktadır (O'Toole ve ark., 2000). Bakterilerin canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak oluşturdukları bu mikroorganizma topluluğu, hücre dışı polimerik bir matriks (EPS) ile kaplıdır. Biyofilm oluşumu aynı zamanda Quorum Sensing (QS) (salt çoğunluk algılama) sinyal mekanizması ile de yakından bağlantılıdır (Hammer ve Bassler, 2003). QS, bakterilerin bulundukları ortamdaki hücre yoğunluklarındaki artışa bağlı olarak genlerin ifadelerinin, bakterinin yararına olacak şekilde yeniden düzenlenmesine aracılık etmektedir. (Parsek ve Greenberg, 2005). Biyofilm yapısı içindeki hücrelerin sayısı belirli bir eşik değerine ulaştığında, QS yoluyla, bakteriler virülans faktörleri üretmeye başlamakta ve gerek biyofilm oluşumu gerekse biyofilm yapısının dağılması regüle edilmektedir. Biyofilmin regüle edilmesinde QS tek belirleyici unsur olmasa da biyofilmin oluşumunda ve antibiyofilm etkili bileşiklerin keşfi çalışmalarında en önemli çalışma alanlarından biri olarak öne çıkmaktadır (Miller ve Bassler, 2001; Solano ve ark., 2014).

Bakteriyel biyofilmler, bakterilerin hayatta kalmasına ve yaşadığı çevrede varlığını sürdürmelerine olanak sağlamaktadır (Dufour ve ark., 2010). Bakterilerin adaptasyonunda ve hayatta kalmasında önemli rol oynayan biyofilm yapısı, canlı dokular dışında tıbbi cihazlar, fabrika boruları, havuzlar ve doğal su sistemleri gibi birçok yüzeyde oluşabilmekte, özellikle tıbbi cihaz yüzeylerinde ve hasta dokularında da oluşarak kalıcı enfeksiyonlara yol açmaktadır (Donlan, 2002; Dongari-Bagtzoglou, 2008; Percival ve ark., 2015; Abebe, 2020). Bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm yapılarının ciddi oranda kontaminasyonlara neden olmasının, halk sağlığı üzerinde olumsuzluklara ve birçok sektörde ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir (Vishwakarma, 2020). Biyofilm yapısı içinde bulunan bakteri hücrelerinin, planktonik hücrelere kıyasla daha korunaklı halde olmalarından dolayı, besin yokluğuna, pH ve

sıcaklık değişikliklerine, oksijen radikallerine, dezenfektanlara, antibiyotiklere ve bağışıklık sistemi hücrelerine karşı planktonik bakterilere göre çok daha dayanıklı oldukları uzun zamandır bilinmektedir. Özellikle kronik bakteriyel enfeksiyonların ortadan kaldırılmasındaki güçlüğün, dirençli biyofilm formu kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Jefferson, 2004). Biyofilm oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan sorunlar başta sağlık, gıda, endüstri ve daha birçok sektörde ciddi sorunlara neden olmakta ve biyofilmle mücadelenin güçlüğü nedeniyle yüksek düzeyde maddi kayba sebep olduğu bilinmektedir. Biyofilm kaynaklı antibiyotik direnci, global halk sağlığı açısından ciddi bir klinik sorunu temsil etmektedir (Ciofu ve ark., 2022). Bu küresel sorun sebebiyle, Avrupa’da her yıl bakteriyel antibiyotik direnci kaynaklı enfeksiyonlara bağlı olarak yaklaşık 25.000 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmektedir (ECDC, 2015).

Her ne kadar planktonik bakteriler antibiyotik kullanımı ile tedavi edilebiliyor olsa da bakteriyel biyofilmlerin oluşması durumunda antibiyotiklere ve diğer kimyasallara karşı artan direnç nedeniyle, bakteriyel kaynaklı hastalıklar tedavi edilemeyecek hale gelmekte ve kronik enfeksiyonlara neden olarak hastalıkların tekrarlanmasına sebep olmaktadır (Lebeaux ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar, bakterilerin antibiyotiğe dirençli biyofilm formuna dönüşmesinin, tedavilerde başarısızlığa sebep olduğunu bildirmektedir (Ostorhazi ve ark., 2013). Bunun yanında, antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olacakları küresel ekonomik yükün 2050 yılına kadar 100 trilyon ABD dolarına ulaşacağı ve buna bağlı ölüm sayısının yılda 10 milyona kadar artacağı tahmin edilmektedir (Gandra ve ark., 2014; Ciloglu ve ark., 2021).

Biyofilm oluşumu bakteriler için yararlı olsa da gıda endüstrisinde ve klinik ortamlarda olumsuz etkileri oldukça fazladır. Örneğin gıda işleme sistemlerinde meydana gelen biyofilmler gıdaların bozulmasına yol açabilmekte ve tüketici sağlığı için tehdit oluşturabilmektedir (Galié ve ark., 2018). Biyofilmlerin oluşturdukları bu sorunlar, halk sağlığında ciddi sorunlara yol açmaktadır (Meireles ve ark., 2016). Özellikle gıda zehirlenmesi salgınlarının en yaygın nedenlerinden biri olan *Bacillus cereus* (*B. cereus*) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bir patojen olması nedeniyle, gıda endüstrisinde ekonomik kayıplara ve gıda kaynaklı sorunlar nedeniyle insan sağlığı üzerinde ciddi sorunlara yol açmaktadır. *B. cereus*’un spor üretimi ve oluşturduğu biyofilm matriksi, dezenfektanlara ve stres koşullarına karşı bakteriyi daha dirençli hale getirmektedir. Aynı zamanda canlı/cansız yüzeylere yüksek oranda yapışma özelliği

nedeniyle oluşturduğu biyofilm yapısını ortadan kaldırmak için genellikle EPS yapısının ortadan kaldırılması ve QS mekanizmasının bozulması veya engellenmesi gibi stratejiler uygulanmaktadır (Bi ve ark., 2021). Özellikle biyofilm yapısının oluşmadan engellenmesi daha efektif bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Gıda endüstrisinde biyofilm yapılarının ortadan kaldırılması için genellikle kimyasal temizlik maddeleri ve dezenfektanlar kullanılmakta ancak buna rağmen bazı durumlarda sonuç alınamamaktadır. Diğer bir açıdan biyofilme karşı sürekli olarak kimyasal kullanımı, insan sağlığı açısından da risk oluşturmaktadır. Bu nedenle bitkisel materyaller başta olmak üzere doğal içerikli ilaç etken maddelerinin araştırmaları ve etkinliklerinin belirlenmesi ilgi çekici hale gelmiştir. Bu nedenle günümüzde bitkisel ve doğal kaynaklı yollar ile biyofilm yapısının ortadan kaldırılması ile ilgili yapılan çalışmalar sıklıkla yürütölmektedir (Yang ve ark., 2023). Biyofilm yapılarının ortadan kaldırılmasında kimyasal ajanlar yerine doğal içerikli ürünlerin belirlenmesi, daha az toksik, çevreci ve ekonomik anlamda sürdürölebilir olacaktır.

Bitkiler ve bitkisel içerikli ürünler geçmişten günümüze hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önemli rol oynayan değerli ve doğal kaynaklardandır. Geleneksel şıfalı bitkiler dünyanın birçok yerinde 2000 yılı aşkın süredir halk sağlığında kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu bitkilerin sağlık açısından kullanılması güvenilir olarak kabul edilmekte ve günümüzde de halen sıklıkla ilaç etken maddesi kaynağı veya halk arasında sıklıkla çeşitli şekillerde kullanılmaktadır (Sánchez ve ark., 2016). Bitkilerin hastalıkların tedavisinde etkili olmasının başlıca sebebinin, içerdikleri antioksidan, fenolik-flavonoid bileşikler, yađ asitleri ve çeşitli sekonder metabolitlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Pant ve ark., 2021). Bitkiler zorlu çevre koşullarında hayatta kalmak için gelişmiş bir savunma mekanizması sonucu oluşturduğu sekonder metabolitlerden dolayı farmasötik açıdan değerli bir kaynaktır. Bitkiler sahip oldukları sekonder metabolitler ve biyolojik aktiviteleri sayesinde çeşitli hastalıkların tedavisinde önemli bir alternatif veya tamamlayıcı ajan haline gelmişlerdir (Sasidharan ve ark., 2011). Bu bileşiklerden birçoğunun özellikle antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelere sahip olması dolayısıyla *in vitro* ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapılarının oluşumunu engellemek ve oluşan yapıların inhibe edilmesi için umut verici doğal kaynaklardan biri olması ve kullanılan kimyasalların aksine çevreye daha az toksik olması nedeniyle

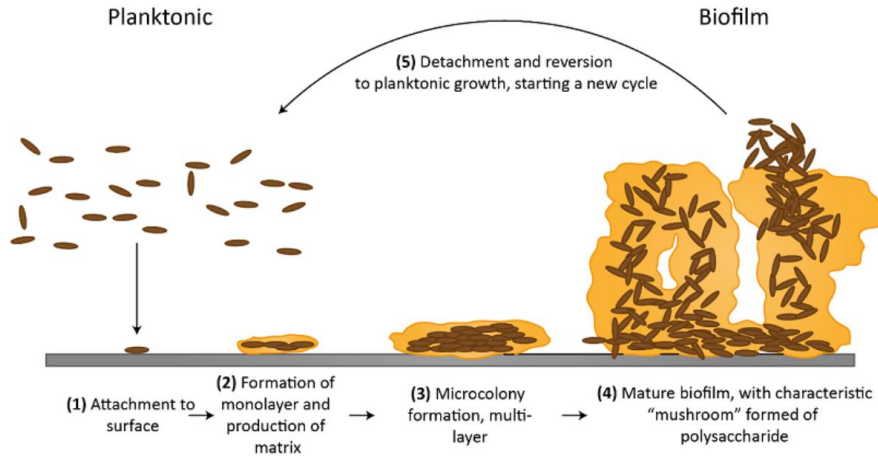
sıklıkla desteklenmektedir (Tatli-Cankaya ve Somuncuoglu, 2021).

Ülkemiz coğrafik ve iklimsel yapısı nedeniyle oldukça zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Ülkemiz’de yayılım gösteren 12000 kadar bitki türü olduğu bildirilmiştir. Bunların 4000 kadarının Türkiye’ye özgü endemik bitkiler olduğu bilinmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021). Özellikle Türkiye endemiği olan bitkilerin içerdikleri biyoaktif bileşenler ve biyoaktiviteleri ile ilgili çalışmalar literatürde oldukça kısıtlı bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan bitkiler, yalnızca Türkiye’de yetişen endemik türlerdir. Endemik bitkilerin aktivitelerine ve içerdikleri bileşenlerin tespitine yönelik çalışmaların artırılması ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi yeni ilaç etken maddelerinin keşfi ve sonuçta ülke ekonomisine katkı sunması açısından son derece değerlidir.

1.1. Biyofilm Oluşum Basamakları ve Yapısı

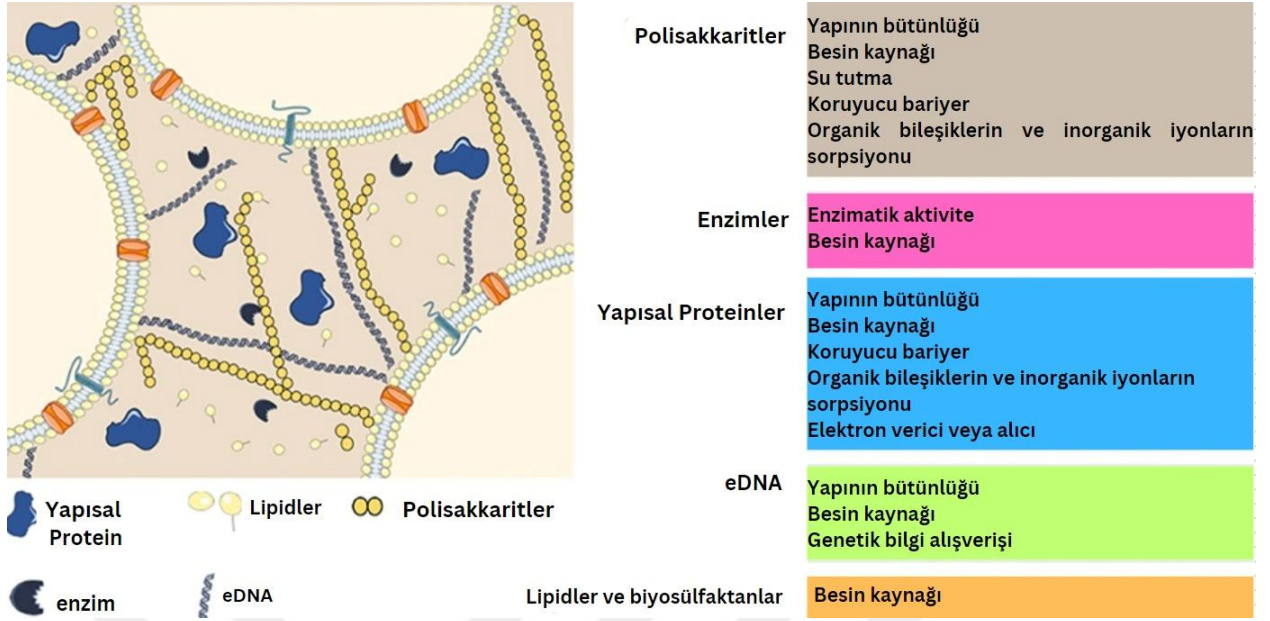
Bakterilerin bir yüzeye tutunup biyofilm oluşturma süreci başlıca beş aşamadan oluşur. Bu süreç oldukça dinamik ve karmaşık bir süreçtir (Yin ve ark., 2019). Bu sürece ait biyofilm oluşum basamakları ve şematik görünümü Şekil 1.1’ de verilmiştir.

1. **Geri dönüşümlü bağlanma:** Organizmanın yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlandığı evredir. Bu evrede organizma çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve eğer şartlar elverişsiz ise planktonik formuna geri dönebilmektedir.
2. **Geri dönüşsüz bağlanma:** Bu aşamada yüzeye tutunan organizmalar EPS üretmeye başlamakta ve EPS’nin adeziv niteliğinden yararlanarak yüzeye daha sıkı tutunmaktadır. Bu aşamada organizmalar yüzeye geri dönüşsüz olarak bağlanmaktadır.
3. **Çoğalma ve koloni oluşumu:** Bu aşamada yüzeye geri dönüşsüz bağlanan organizmalar hızla çoğalmaya başlamakta ve mikrokoloniler oluşmaktadır.
4. **Olgunlaşma:** Bu evrede biyofilm yapısı içerisindeki organizmalar, oksijen ve besini biyofilm yapısı içerisinde taşımak için mikro kanallar oluşturmaktadırlar. Böylece biyofilm tabakası, aralarında kanallar bulunan, hücrelerle dolu üç boyutlu halini kazanmaktadır.
5. **Ayrılma:** Son evrede ise biyofilm tabakası içerisindeki yetersiz oksijen ve besinden dolayı olgun biyofilm yapısı dağılıp ayrılmaktadır. Planktonik hale geçen bakteriler yeni bir yüzeye yapışarak bu döngüyü tekrar etmektedirler (Unosson, 2015; Berhe ve ark., 2017).



Şekil 1.1. Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi. 1) Bakterinin canlı/cansız bir yüzeye geri dönüşümlü bağlanması. 2) Geri dönüşümsüz bağlanma ve EPS üretimi 3) Mikrokoloni oluşumu 4) Olgun biyofilm formu. 5) Ayrılma ve döngünün tekrarlanması. (Hollmann ve ark., 2022)

Biyofilm yapısı kısaca, organizmalardan ve organizmaların içine gömülü olduğu matriks tabakasından oluşmaktadır. Bu matriks tabakası, organizmalardan sentezlenen ve EPS adı verilen hücre dışı polimerik yapılardan oluşmaktadır. EPS bileşimi patojenin türüne, biyofilmin yaşına ve çevresel faktörlere göre değişiklik göstermektedir (Kostakioti ve ark., 2013). EPS yapısında başta ekso polisakkaritler olmak üzere, çeşitli proteinler, glikoproteinler, glikolipitler, EPS modifiye edici enzimler ve hücre dışı DNA (ekstraselüler DNA veya kısaca eDNA) gibi birçok bileşen bulunmaktadır (Flemming ve ark., 2007). EPS yapısında bulunan enzimler, bir yüzeye yapışan organizmanın enerji elde etmesinde önemli rol oynarken, proteinler ise bakterilerin pililerinin oluşmasına destek sağlayarak yüzeye yapışmalarını sağlamaktadır. Üretilen bu pililer geri dönüşsüz evrede bakteri bağlandıktan sonra yok olmaktadır. eDNA ise bakterileri dezenfektanlardan ve çevresel faktörlerden koruyucu bir işlev görmektedir. Ayrıca eDNA, yatay gen transferi yoluyla bakteriyel biyofilmlerin genetik çeşitliliğinin artırılmasını sağlamaktadır (Flemming ve Wingender, 2010).



Şekil 1.2. EPS matriksinin bileşimi ve ana bileşenlerin işlevleri (Pinto ve ark., 2020)

1.2. *Bacillus cereus* Sistematığı ve Genel Özellikleri

1.2.1. *B. cereus* Sistematığı

Alem: Bacteria

Şube: Bacillota

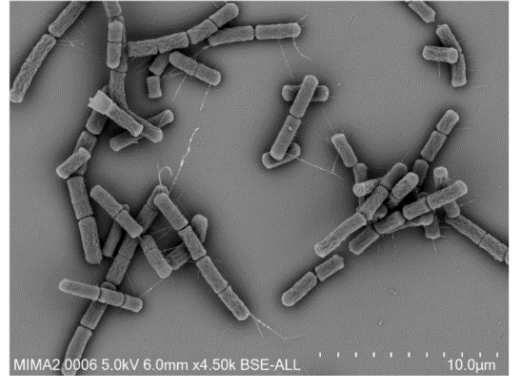
Sınıf: Bacilli

Takım: Caryophanales

Aile: Bacillaceae

Cins: *Bacillus*

Tür: *Bacillus cereus*



Şekil 1.3. *B. cereus*'un elektron mikroskop görüntüsü (Ramaraio ve ark., 2020).

1.2.2. Karakteristik Özellikleri ve Morfolojisi

Gram-Pozitif bir bakteri olan *B. cereus*, aerobik veya fakültatif anaerobik, hareketli, çubuk şekilli spor oluşturabilme yeteneğine sahip, morfolojik olarak kolonileri büyük ve oldukça geniş yayılım göstermekte olan bir bakteridir (Ehling-Schulz ve ark., 2019). *B. cereus* doğal olarak çürüyen organik maddelerde, tatlı sularda, deniz sularında, yiyeceklerde, kümes hayvanlarında vs. bulunmaktadır. Bulunduğu bu ortamlardan herhangi biri sebebiyle, toprak ve gıda ürünlerinin kontaminasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Jessberger ve ark., 2020).

B. cereus özellikle, nişastalı gıdalar ve pirinç, çiğ ve minimum düzeyde işlenmiş sebzeler, süt ve süt ürünleri, ekmek, tüketime hazır gıdalar ve et ürünleri gibi birçok gıdadan izole edilmektedir (Samapundo ve ark., 2011). Gıda yolu ile insanlara bulaştığında ilk olarak bağırsakta lokalize olmaktadır (Bottone, 2010). Enfeksiyon durumunda gözlemlenen semptomları arasında yaygın olarak kusma ve ishal görülmektedir. Bu bakteri, doğal ortamda bol miktarda bulunması ve endospor oluşturma yeteneğiyle, zorlu çevre koşullarında hayatta kalabilmektedir (Chemat ve ark., 2017). Spor oluşturan bakterilerin dirençli sporları bu türe ait bireyleri pastörizasyon gibi gıda işlemlerinden korumaktadır (Pereira ve Sant'Ana, 2018). *B. cereus* her ne kadar gıda zehirlenmesi ve gastrointestinal hastalıklarla ilişkilendirilse de gastrointestinal sistem hastalıkları dışında da ciddi ve ölümcül hastalıklara yol açabilmektedir (Adame-Gómez ve ark., 2020). Klinik vakalarda pnömoni, cerrahi yara enfeksiyonu ve menenjit gibi sağlık sorunlarına da yol açtığı bilinmektedir (Kuroki ve ark., 2009). *B. cereus*, çeşitli zamanlarda birçok gıda kaynaklı salgına neden olmuş ve gıda zehirlenmelerinin en büyük sebeplerinden biri olarak ortaya çıkmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin (ECDC) 2015 yılındaki raporuna göre, Avrupa Birliğindeki gıda kaynaklı salgınların en yaygın dördüncü kaynağının *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir (Rahnama ve ark., 2023).

1.2.3. *B. cereus* Biyofilm Yapısı ve Etkileri

B. cereus bakterisi tarafından oluşturulan biyofilm tabakası, bakterinin zorlu çevresel koşullarda hayatta kalmasını sağlayarak dayanıklılığını arttırmaktadır (Duport ve rak., 2016; Tuipulotu ve ark., 2021). *B. cereus* biyofilmlerinin klinik ortamlarda ve gıda endüstrisinde ciddi sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmektedir (Gurler ve ark., 2012). *B. cereus*'un biyofilm matriks bileşiminde başlıca; ekzopolisakkaritler, proteinler, karbonhidratlar ve eDNA bulunmaktadır (Wagner ve ark., 2009; Karunakaran ve Biggs, 2011). Matriks bileşiminin içerisinde bulunan bu yapıların, *B. cereus*'un biyofilm tabakasını zorlu çevresel koşullardan koruduğu bildirilmiştir (Vilain ve ark., 2009). Yüzen planktonik hücreler ve biyofilm yapısı karşılaştırıldığında, biyofilm yapısındaki azalan metabolizma ve hücreler içindeki yüksek DNA transferi gibi faktörler, biyofilm yapısının zorlu koşullarda hayatta kalması için avantaj sağladığı çeşitli çalışmalarca ortaya çıkartılmıştır (Chmielewski ve Frank,

2003; Davies, 2003). *B. cereus*, hava-sıvı ara yüzü biyofilmleri, batık biyofilmler ve peliküller (yüzen biyofilm) dahil olmak üzere hem statik hem de akış koşulları altında farklı biyofilm türleri oluşturmaktadır (Hussain ve Oh, 2017). Günümüzde *B. cereus* suşlarında toksin üretimi, sporülasyon ve biyofilm oluşumu arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmektedir (Huang ve ark., 2020). Araştırmalar sonucunda gelişim aşamasında endosporların üretiminin, sporların sterilizasyon işlemleri sonrasında hayatta kalabilmesi yeteneği nedeniyle biyofilm yapısının da ortadan kaldırılmasında zorluklara neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *B. cereus* tarafından üretilen hemolitik olmayan toksinler (NHE), hemolizin BL (HBL) ve sitotoksin K (CytK) gibi enterotoksinlerin de biyofilm yapısının kalıcılığında etkilerinin olduğu bilinmektedir (Lin ve ark., 2022).

B. cereus biyofilmi her ne kadar gıda endüstrisi ile bağdaştırılmış olsa da çok çeşitli alanlarda ve ortamlarda sorunlara yol açmaktadır. Örneğin Ikram ve arkadaşlarının 2019 yılında yürüttüğü bir çalışmada, kalp hastalarının santral venöz kataterlerinden (CVC) izole edilen biyofilm tabakasının sorumlusunun *B. cereus* olduğu saptanmıştır. Çalışmada *B. cereus*'un aynı zamanda bağırsak duvarında da güçlü biyofilm oluşturduğu ve bu nedenle hastalarda geçmeyen diyareye sebep olduğu belirlenmiştir (Ikram ve ark., 2019). *B. cereus*'un güçlü bir enfeksiyonu indüklemesi ve biyofilm üretebilmesi için bağırsak epitellerine yerleşmesi ve çoğalması gerekmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, *B. cereus*'un insan bağırsak epitel hücrelerine yerleştiği ve hem katı-sıvı hem de sıvı-hava ara yüzlerinde biyofilmler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Oluşan biyofilm tabakası içindeki bakteriler insan bağışıklık hücrelerinden korunmakta ve antimikrobiyallere karşı daha az duyarlı hale gelmektedir. Bu da biyofilmleri içeren kronik enfeksiyonların tedavi edilmesinin neden bu kadar zor olduğunu açıklamaktadır (Tran vd., 2010). *B. cereus* suşlarının ürettiği biyofilm tabakası sağlık alanında yol açtığı sorunların yanında, gıdalarda ve gıda fabrikalarındaki borular ve makinelerde de sorunlara yol açarak gıda güvenliğini tehlikeye atmaktadır (Adame-Gómez ve ark., 2020). *B. cereus*, süt ürünlerinin imalatı sırasında oluşan ve nihai ürünlerde kontaminasyona neden olan biyofilm ve spor oluşumu nedeniyle süt endüstrisi için de endişe kaynağıdır (Huang ve ark., 2022). Fei ve arkadaşları 2019 ve 2021 yılında yürüttükleri çalışmalarda *B. cereus*'un paslanmaz çelik borular üzerinde biyofilm üretme yeteneğini araştırmışlardır ve izolatların %66.7'sinin yüksek biyofilm

oluşturma yeteneğinin olduğunu keşfetmişlerdir (Fei ve ark., 2019; Fei ve ark., 2021). Bu nedenle özellikle gıda endüstrisinde ortaya çıkan *B. cereus* kaynaklı biyofilm yapılarının meydana getirdiği hasarları gidermeye ve en azından azaltmaya dönük olarak biyofilm inhibe edici yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Bitkilerin Sistematığı ve Özellikleri

Bu tez kapsamında Türkiye'ye endemik olan *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina* (Eski adı ile *Cirsium byzantinum* ve *Cirsium polycephalum*), *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* ve *Euphorbia amygdaloides* subsp. *robbiae* bitkilerinin sistematikleri ve bitki türlerine ait özellikler 1.3.1-1.3.4 arasında verilmiştir.

1.3.1. *Centaurea kilaea* ve *Centaurea hermannii* Sistematığı ve Özellikleri

Alem: Plantae

Bölüm: Streptophyta

Sınıf: Equisetopsida

Takım: Asterales

Familya: Asteraceae

Cins: *Centaurea*

Tür: *Centaurea kilaea*



Şekil 1.4. *C. kilaea* bitkisi genel görünümü (Eskin ve ark., 2013).

Alem: Plantae

Bölüm: Streptophyta

Sınıf: Equisetopsida

Takım: Asterales

Familya: Asteraceae

Cins: *Centaurea*

Tür: *Centaurea hermannii* (<https://powo.science.kew.org/> Erişim Tarih:

20/05/24)



Şekil 1.5. *C. hermannii* bitkisi genel görünümü (Yucel, 2022).

Çalışmada kullanılan *Centaurea kilaea* ve *Centaurea hermannii* bitkileri *Centaurea* cinsine mensup bitkilerdir. *Centaurea* türlerinin uzun yıllardır ateş düşürücü, ishal kesici, adet söktürücü vb. şekilde kullanıldığı bilinmektedir (Chemsal ve ark., 2018). *Centaurea* cinsine ait bitkilerin özütlerinden, antibakteriyel özelliklere sahip olabilecek sekonder metabolitler, terpenler ve alkaloidler izole edilmiştir (Reyhan ve ark., 2004; Köksal, 2014). Daha önce yapılan çalışmalarda *C. kilaea* bitkisinin antibakteriyel etkinliği olduğu ve antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Şen ve ark., 2013; Sekerler ve ark., 2018).

1.3.2. *Lophiolepis byzantina* Sistematığı ve Özellikleri

Alem: Plantae

Bölüm: Streptophyta

Sınıf: Equisetopsida

Takım: Asterales

Familya: Asteraceae

Cins: *Lophiolepis*

Tür: *Lophiolepis byzantina* (<https://powo.science.kew.org/> Erişim Tarih:

20/05/24)

Cirsium byzantinum ve *Cirsium polycephalum* olarak bilinen *Lophiolepis byzantina*, Türkiye’de yetişen endemik bir bitkidir (Del Guacchio ve ark., 2022). Halk dilinde Hoş kangal olarak da bilinen *L. byzantina* türü hakkında taksonomik çalışmalar dışında ne yazık ki bilimsel bir yayın bulunmamaktadır. Bunun yanında, *Cirsium* üyelerinin yetiştikleri bölgelerdeki halk tarafından tıbbi olarak sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Yıldırım ve ark., 2020). Çok çeşitli çiftleşme sistemlerine sahip olduğundan, tozlaşma biyolojisi için model organizma olarak kabul edilen *Cirsium* cinsine mensup türlerin bal üretimi için de iyi bitkiler arasında olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca *Cirsium* cinsinin flavonoidler, antioksidanlar ve fenolik bileşikler açısından zengin türler barındırdığı belirtilmektedir (Ozcan ve ark., 2016; Ozyigit ve ark., 2018). Üstelik bu cinsin idrar söktürücü, antihemorajik, antihepatit, antihipertansif antidiyabetik ve antiseptik aktivitelerine sahip oldukları ve karaciğer ve rahim kanserleri ile lösemi tedavilerinde kullanıldığı bildirilmektedir (Ozyigit ve ark., 2018). Ancak

Cirsium cinsinde bulunan birçok tür, nadir dağılımları ve yok olma tehlikeleri sebebiyle koruma altına alınmıştır (Powell ve ark., 2011).



Şekil 1.6. *L. byzantina* bitkisi genel görünümü.

1.3.3. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* Sistematığı ve Özellikleri

Alem: Plantae

Bölüm: Streptophyta

Sınıf: Equisetopsida

Takım: Asterales

Familiya: Campanulaceae

Cins: *Campanula*

Tür: *Campanula lyrata*

Alt tür: *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* (<https://powo.science.kew.org/> Erişim

Tarih: 20/05/24)

Campanula L. (*Campanulaceae*) cinsi, 95'i Türkiye topraklarında yetişen ve 61'i Türkiye'ye endemik 113 yerli tür ile temsil edilmektedir (Damboldt ve ark., 1988; Sunta ve ark., 2015). *Campanula* türleri, geleneksel tıpta larenjit, bronşit, bademcik iltihabı ve siğiller gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Roi, 1955). *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* alttürünü bünyesinde barındıran *Campanula* cinsi Türkiye'de çançiçeği olarak bilinmekte olup, geleneksel halk sağlığında yara iyileşmesinde ve iltihaplı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Baytop, 1999). Üstelik *Campanula* cinsine mensup türlerin uyarıcı, canlandırıcı, antiviral, sitotoksik, antioksidan, spazmolitik, antialerjik, antiflojistik ve ve antimikrobiyal etkinlikleri olduğu belirtilmektedir (Benli ve ark., 2008; Park ve ark., 2010).



Şekil 1.7. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* bitkisi genel görünümü.
(<https://kocaelibitkileri.com> Erişim Tarihi: 25/05/24)

1.3.4. *Euphorbia amygdaloides* subsp. *robbiae* Sistematığı ve Özellikleri

Alem: Plantae

Bölüm: Streptophyta

Sınıf: Equisetopsida

Takım: Malpighiales

Familya: Euphorbiaceae

Cins: *Euphorbia*

Tür: *Euphorbia amygdaloides*

Alt tür: *Euphorbia amygdaloides* subsp. *robbiae* (<https://powo.science.kew.org/>
Erişim Tarih: 20/05/24)

Euphorbia L. (Euphorbiaceae) cinsi, 2150'den fazla tür barındırmasıyla (Bruyns ve ark., 2006) çiçekli bitkilerin en büyük cinslerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Türkiye’de sütleğen olarak da bilinen bu cins, Akdeniz bölgesinde en yüksek çeşitliliğe sahip 90'dan fazla türle temsil edilmektedir (Radcliffe-Smith, 1982). *Euphorbia* cinsine mensup *Euphorbia amygdaloides* subsp. *robbiae* alttürü, tomurcukları ve yapraklı sürgünleri taşıyan uzun koyu kahverengi rizomlu bir bitki olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak 1891 yılında Bayan Mary Anne Robb tarafından toplanan ve çok yıllık bitki olan *E. amygdaloides* subsp. *robbiae* Türkiye’ye endemiktir (Can ve ark., 2012).



Şekil 1.8. *E. amygdaloides subsp. robbiae* bitkisi genel görünümü.
(<https://kocaelibitkileri.com> Erişim Tarihi: 25/05/24)

Amaç

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen tez çalışmasında hem ciddi sağlık sorunlarına hem de ekonomik anlamda ciddi kayıplara neden olan *B. cereus* bakterisinin meydana getirdiği sorunlarla başa çıkabilmek için doğal çözüm yollarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

- Türkiye'ye özgü endemik bitki türlerinden olan *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata subsp. lyrata* ve *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* bitkilerin toplanması ve teşhis edilmesi,
- Toplanan endemik bitki örneklerinden iki farklı polariteye sahip metanol ve etil asetat çözücülerini ile özüt eldesi,
- Bitki özütlerinin *B. cereus* bakterisi üzerinde farklı yöntemler ile (MİK, Disk difüzyon) antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesi,
- Bitki özütlerinin antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri Suşu

- *B. cereus*

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

1. Bacto Agar (BD-BD)
2. Mueller Hinton Broth Besiyeri (Biolife – İtalya)
3. Tryptic Soy Broth Besiyeri (Sigma – Almanya)
4. D(+) – Glucose Anhydrous (Panreac – İspanya)
5. Etil Asetat (Sigma – Almanya)
6. Metanol (Sigma – Almanya)
7. Etanol (Sigma – Almanya)
8. Glasiyal Asetik Asit (Sigma – Almanya)
9. Dimetil Sülfoksit (Biofroxx – Almanya)
10. Kristal Viyole (Sigma – Almanya)
11. PBS Tablet (Bioshop – Kanada)
12. Kanamisin (HiMedia – Hindistan)
13. Sodyum Klorür – NaCl (Sigma – Almanya)
14. Peptone from Casein (HiMedia – Hindistan)
15. Phenol Red (Sigma – Almanya)
16. 96 Kuyucuklu Mikroplaka TPP 92096 (TPP – İsviçre)
17. Whatman Antibiyotik Diskleri (Sigma – Almanya)
18. Ependorf 1.5 ml’lik
19. 0,45µl’lik Filte
20. 10µl, 100 µl, 1000 µl Pipet uçları (Axygen-ABD)
21. Quartz Küvet (1400 µl) (Hellma-Almanya)
22. Plastik Petri Kapları (Fıratmed – Türkiye)
23. Kaba Filtre Kâğıdı
24. Nitril Eldiven (Broche – Türkiye)

25. Steril Falkon Tüp (İsolab – Türkiye)
26. Platin Öze
27. Cam Baget
28. Bek Alevi
29. Distile Su
30. Otoklav Şişesi
31. Şilifli Cam Balon
32. Cam Huni
33. Portüp
34. Alüminyum Folyo (Koroplast – Türkiye)

2.1.3. Kullanılan Cihazların Listesi

1. **Dijital Hassas Terazı (Ohaus - ABD):** Besiyerlerinin, antibiyotiğin, kimyasalların ve kuru özütlerin tartılmasında kullanılmıştır.
2. **Derin Dondurucu (Vestel - Türkiye):** Kuru özütlerin, antibiyotiklerin uzun süreli, bakteri stoklarının kısa süreli -20°C’de muhafaza edilmesi için kullanılmıştır.
3. **Buzdolabı (Siemens - Almanya):** Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve farklı besiyerlerinin +4 °C’de muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.
4. **Ultra Derin Dondurucu (Esco - Singapur):** Bakteri stoklarının -80°C’de uzun süre saklanması için kullanılmıştır.
5. **Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek - ABD):** Absorbans ölçümlerinin yapılmasında kullanılmıştır.
6. **Mikroplaka Yıkayıcı (BioTek - ABD):** Bakterilerin biyofilm deneylerinde plakanın kuyucuklarının yıkanmasında kullanılmıştır.
7. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman Coulter - ABD):** Deney esnasında kullanılacak bakterilerin absorbans ölçümlerinin yapılmasında kullanılmıştır.
8. **Rotary Evaporatör (Heidolph - Almanya):** Bitki özütlerinin elde edilmesinde çözücünün uzaklaştırılması için kullanılmıştır.
9. **Manyetik Karıştırıcı (WiseStir - Almanya):** Kimyasalların, besiyerlerinin ve boyanın hazırlanmasında kullanılmıştır.

- 10. İnkübatör (Memmert - Almanya):** Bakterilerin uygun sıcaklıkta inkübe edilmesi için kullanılmıştır.
- 11. Steril Güvenlik Kabini (Faster ve Esco - İtalya ve Singapur):** Özütlerin, kimyasalların hazırlanmasında ve deneylerin gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır.
- 12. Vorteks (Heidolph - Almanya):** Kimyasalların, özütlerin ve sıvı bakteri kültürlerinin homojen karışması için çalkalanmasında kullanılmıştır.
- 13. pH Metre (Thermo - A.B.D.):** Deneylerde kullanılacak besiyerlerinin pH ayarlamasının yapılması amacıyla kullanılmıştır.
- 14. Mikropipetler (Thermo/Finnpipette - ABD):** Besiyerlerinin, kimyasalların, bakteri kültürlerinin ve özütlerin aktarılması için kullanılmıştır.
- 15. Otoklav (Nüve - Türkiye):** Cam malzemelerin ve hazırlanan besiyerlerinin steril edilmesinde kullanılmıştır.
- 16. Distile Su Cihazı (Millipore - A.B.D.):** Besiyerleri ve antibiyotiklerin hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

2.1.4. Besiyerlerinin Hazırlanması ve Kullanım Amaçları

Tablo 2.1. Kullanılan besiyerlerinin kullanım amaçları.

Besiyeri	Kullanım Amacı
Tryptic Soy Broth	Bakterinin sıvı ortamda çoğaltılması için ve biyofilm deneylerinde kullanılmıştır.
Tryptic Soy Agar	Bakterinin katı ortamda büyütülmesi için kullanılmıştır.
Mueller Hinton Broth	MİK ve antibakteriyel etkinliğin belirlenmesi deneylerinde kullanılmıştır.
Mueller Hinton Agar	Disk difüzyon deneylerinde kullanılmıştır.
Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar	Bakterinin selektif besiyeridir. Stok alırken ve stok açarken kullanılmıştır.

2.1.4.1. Tryptic Soy Broth Besiyeri

Tablo 2.2. Tryptic Soy Broth besiyerinin hazırlanması.

Tryptic Soy Broth (TSB)	
Pankreatik kazein pepton	17 g/L
Dipotasum hidrojen fosfat	2.5 g/L
Glukoz	2.5 g/L
NaCl	5 g/L
Soya pepton	3 g/L
<u>Hazırlanışı:</u> 30 gram TSB tartılıp uygun miktarda distile su ile çözündürülmüştür. Çözöldükten sonra besiyeri hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi için 15 dakika 121°C'de otoklavlanmış ve +4 °C'de deneylerde kullanılana kadar saklanmıştır.	

2.1.4.2. Mueller Hinton Broth Besiyeri

Tablo 2.3. Mueller Hinton Broth besiyerinin hazırlanması.

Mueller Hinton Broth (MHB)	
Sığır özü	2 g/L
Kazein Hidrolizat	17.5 g/L
Nişasta	1.5 g/L
<u>Hazırlanışı:</u> 22 gram MHB tartılıp uygun miktarda distile su ile çözödürölmüştür. Çözöldükten sonra besiyeri hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi için 15 dakika 121°C'de otoklavlanmış ve +4 °C'de deneylerde kullanılana kadar saklanmıştır.	

2.1.4.3. Tryptic Soy Agar Besiyeri

Tablo 2.4. Tryptic Soy Agar besiyerinin hazırlanması.

Tryptic Soy Agar (TSA)	
Pankreatik kazein pepton	17 g/L
Dipotasum hidrojen fosfat	2.5 g/L
Glukoz	2.5 g/L
NaCl	5 g/L
Soya pepton	3 g/L
Hazırlanışı: 30 gram TSB ve 16 gram Bacto agar tartılıp uygun miktarda distile su ile çözdürülmüştür. Çözöldükten sonra besiyeri hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi için 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmış ve sterilizasyon işlemi bittikten sonra besiyeri soğutulmuştur. Ardından steril kabinde 90 mm çapındaki plastik petri kaplarına 10 ml dağıtılmıştır ve +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.	

2.1.4.4. Mueller Hinton Agar Besiyeri

Tablo 2.5. Mueller Hinton Agar besiyerinin hazırlanması.

Mueller Hinton Agar (MHA)	
Sığır özü	2 g/L
Kazein Hidrolizat	17.5 g/L
Nişasta	1.5 g/L
Hazırlanışı: 22 gram MHB ve 16 gram Bacto agar tartılıp uygun miktarda distile su ile çözdürülmüştür. Çözöldükten sonra besiyeri hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi için 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmış ve sterilizasyon işlemi bittikten sonra besiyeri soğutulmuştur. Ardından steril kabinde 90 mm çapındaki plastik petri kaplarına 10 ml dağıtılmıştır ve +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.	

**2.1.4.5. Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar Besiyeri (*B.cereus*
Selektif Besiyeri)**

Tablo 2.6. Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar besiyerinin hazırlanması.

Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP)	
Agar	15 g/L
D-Mannitol	10 g/L
Pepton	10 g/L
NaCl	10 g/L
Sığır ekstraktı	1 g/L
Phenol red	0,025 g/L
Yumurta sarısı emülsiyonu (%50)	50 ml/L
Yumurta Sarısı Emülsiyonu (%50)	
Yumurta sarısı	11 adet
Bütün yumurta	1 adet
NaCl (%0,9 w/v solüsyon)	50 ml
<u>Yumurta Sarısı Solüsyonu (%50) Hazırlanması:</u> Yumurtaların dış yüzeyleri etanol ile steril edilmiştir. 11 adet yumurtanın sarısı ayrılmıştır ve bir bütün yumurta ile çırpılmıştır. 50 ml yumurta karışımı ile 50 ml %0,9'luk NaCl solüsyonu karıştırılmıştır.	
<u>Besiverinin Hazırlanışı:</u> Yumurta sarısı solüsyonu hariç bütün bileşenler birleştirilip 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi için 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra besiyeri 40 °C'ye kadar soğutulmuştur. 40 °C sıcaklığa düştükten sonra 50 ml %50'lik yumurta sarısı solüsyonu eklenmiştir. Ardından steril kabinde 90 mm çapındaki plastik petri kaplarına 10 ml dağıtılmış ve +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.	

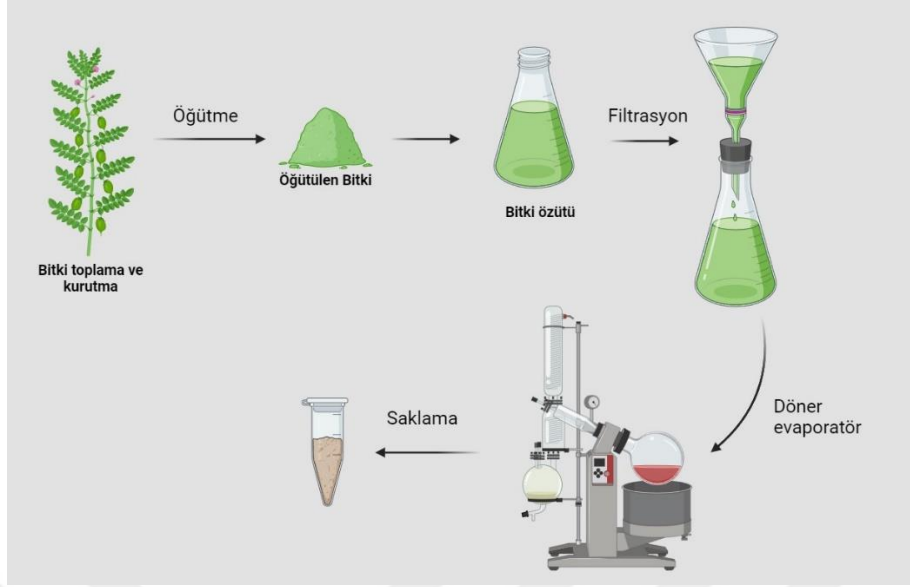
2.2. Yöntem

2.2.1. Bitki Materyallerinin Temini

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitki örneklerinin tamamı Türkiye’ye endemik bitkileridir. Örnekler İstanbul bölgesinden toplanmıştır. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata*, *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *robbiae* ve *Centaurea hermannii* Aydos Ormanı’ndan, *Centaurea kilaea* Şile sahilindeki kumullardan ve *Cirsium polycephalum* Ballıkayalar Tabiat Parkı’ndan toplanmıştır.

2.2.2. Bitki Özütlерinin Eldesi

Tez çalışmasında kullanılan bitki örnekleri uygun koşullarda toplandıktan sonra, deneylerde kullanılacak yaprakları ayırılıp akan su altında 15 dk yıkanarak toz ve kirlerinden arındırılmıştır. Yıkanan yaprak örnekleri uygun koşullar altında açık havada kurutulmuştur. Kurutma işlemi gerçekleşen yaprak örnekleri yüzey alanının artırılması için havanda dövülerek küçük parçalara ayrılmıştır. Her bir bitki örneğine ait yapraklardan 15’er g tartılarak steril cam şişelere konularak uygun etiketleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından etkinlikleri test edilecek metanol ve etil asetat çözücüler 150 ml eklenip 24 saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda çözücüler filtre kâğıdı ile süzülüp her bir gruba ait çözücüler cam şişelere alınmış ve bu işlem üç defa tekrarlanmıştır. Bitki örneklerine ait kuru özütlerin eldesi için döner evaporatör kullanılmış ve özütlerin içindeki çözücüler döner evaporatörde kontrollü bir şekilde, uygun sıcaklıkta ve düşük basınç altında çözücüler uzaklaştırılarak kuru özütler elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilere ait kuru özütler deneylerde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Bennour ve ark., 2020). Antibakteriyel ve antibiyofilm testlerinde etkinliklerini belirlemek için her bir bitki grubuna ait özütler tartılarak her bir grubun maksimum çözünebilme konsantrasyonları belirlenmiştir. Özütlerin son konsantrasyonlarının stokları 60-16 mg/ml aralığında olacak şekilde saf dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanmıştır. Örneklerle ait stoklar, antibakteriyel ve antibiyofilm deneylerinde kullanılan besiyeri ile seyreltilip etkinlikleri test edilmiştir.



Şekil 2.1. Bitkilerden özüt eldesi aşamalarının şematik gösterimi. (<https://www.biorender.com> kullanılarak hazırlanmıştır.)



Şekil 2.2. Bitki özütlerinin eldesi. a) Kurutulan bitki örnekleri. b) Bitki örneklerine çözücülerin eklenmesi. c) Süzülen özütlerin döner evaporatör kullanılarak çözücülerin ortamdan uzaklaştırılması.

2.2.3. Bakterinin Temin Edilmesi, oğaltılması ve Saklanması

Tez çalışmasında kullanılan *B. cereus* gıda patojeni Eurofins İstanbul Gıda Kontrol Lab. tarafından temin edilmiştir. Temin edilen *B. cereus* bakterisi TSB besiyeri içerisinde 37 °C’de büyütülmüş ve koloni morfolojisini gözlemleyebilmek için TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile pasaj alınarak uygun şartlarda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra üremesi gerçekleşen *B. cereus* bakterisi %10’luk (w/v) steril skim milk solüsyonu ile stok alınmış ve stoklanan bakteri – 80 °C’de deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

- Skim milk solüsyonunun hazırlanması; 10 g skim milk tozu tartılıp, 100 ml distile su ile tamamlanmıştır ve 121 °C’de 5 dk otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Bitkilerin Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

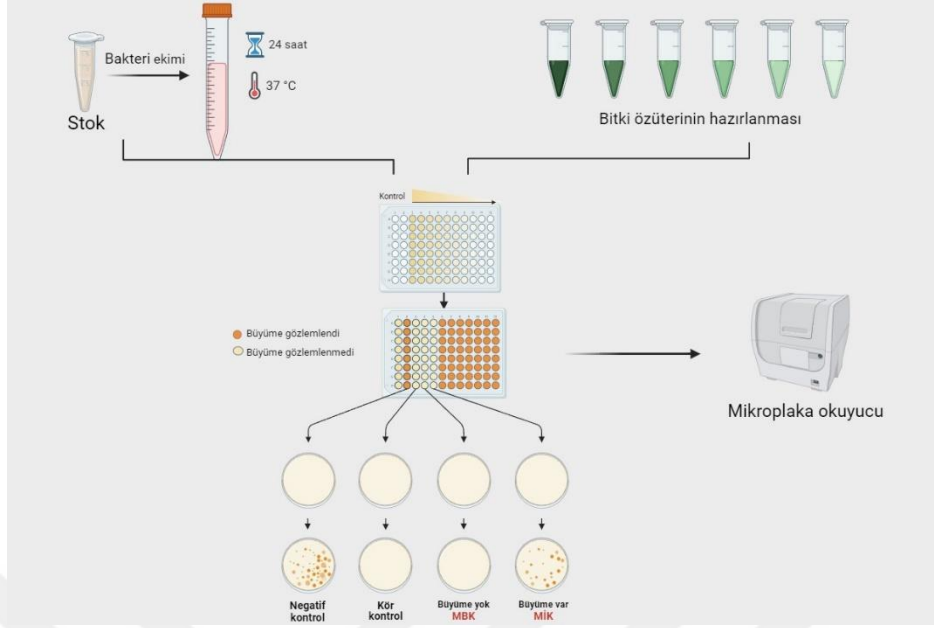
Tez çalışmasında kullanılan bitkilerin metanol ve etil asetat özütlerinin *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinliğini test etmek için 96 kuyucuklu mikrolakada seri dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikrolakanın negatif kontrol (bakteri), test grupları (özüt+bakteri)’na 100 µl, yalnızca besiyeri içeren kuyucuklara (kör) ise 200 µl MHB eklenmiştir. Özütlere ait konsantrasyonların test edilmesi için mikrolakada ilk kuyucuğa %4 DMSO’dan başlayacak şekilde seyreltilmiş özütlerden 100 µl eklenmiş ve ardından özüt ve besiyerinin homojen hale gelmesi için pipetaj yapılmıştır. Homojen hale gelen özüt+besiyeri ilk kuyucuğundan 100 µl çekilerek bir sonraki kuyuya aktarılmış ve bu işlem 5 kez tekrar edilmiş olup, özütler seri dilüsyon ile 6 kat seyreltilmiştir. Böylelikle her kuyucuk bir önceki kuyucuğa göre ½ oranında seyreltilmiştir. Negatif kontrol olan kuyucuklara özüt eklenmemiştir, sadece besiyeri ve bakteri süspansiyonu dağıtılmıştır. Özüt seyreltme işlemi de tamamlandıktan sonra antibakteriyel etkinlikleri test etmek için OD 0.02 yoğunluğundaki *B. cereus* bakterisi kör kuyular hariç her kuyuya 100 µl eklenmiştir. Mikrolakalar alkalayıcı kullanılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Özütlerin *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesi için multimod mikrolaka okuyucuda OD 450 nm’de absorbans ölçümleri alınmıştır. Antibakteriyel deneylerde pozitif kontrol olarak kanamisin antibiyotiği kullanılmış ve istatistiksel anlamlılığın belirlenmesi için deneyler 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Bala ve ark., 2011).

Tablo 2.7. Antibakteriyel deneylerde kullanılan bitkilerin stok ve uygulanan konsantrasyonları.

Bitkiler	Çözücü	Stok(mg/ml)	Uygulanan İlk Doz
<i>Centaurea kilaea</i>	Metanol	60	2.4 mg/ml
<i>Centaurea kilaea</i>	Etil Asetat	60	2.4 mg/ml
<i>Centaurea hermannii</i>	Metanol	40	1.6 mg/ml
<i>Centaurea hermannii</i>	Etil Asetat	30	1.2 mg/ml
<i>Lophiolepis byzantina</i>	Metanol	30	1.2 mg/ml
<i>Lophiolepis byzantina</i>	Etil Asetat	20	800 µg/ml
<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i>	Metanol	24	960 µg/ml
<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i>	Etil Asetat	16	640 µg/ml
<i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i>	Metanol	40	1.6 mg/ml
<i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i>	Etil Asetat	16	640 µg/ml

2.2.5. Bitki Özütlерinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Belirlenmesi

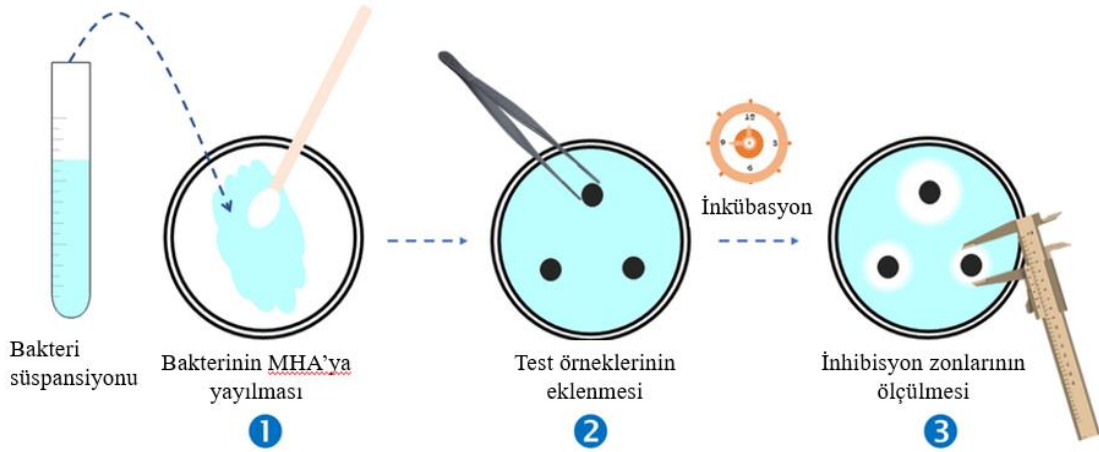
B. cereus' un üremesinin engellendiği en düşük özüт konsantrasyonu olan minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi için, 2.2.4'de gerçekleştirilen antibakteriyel etkinliklerinin sonuçlarına göre uygun görülen özüтlerde aralıklarda özüт konsantrasyonları denenmiştir. Deneyler 2.2.4. başlıklı antibakteriyel etkinlik yönteminde açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerekli bütün ara dozlar taranarak, özüтlerin üremeyi engellediği minimum inhibitör konsantrasyonu bulunmuştur. Multimod plaka okuyucuda alınan OD 450 nm'deki absorbans ölçüm sonuçlarına göre gerekli konsantrasyonlar ve negatif kontrol kuyuları MHA besiyerine ekilmiştir ve gerçekten minimum inhibitör konsantrasyonu olup olmadığı gözlemlenmiştir (Morgana ve ark., 2020; Bussmann ve ark., 2010).



Şekil 2.3. Bitki özütlerinin antibakteriyel etkinliklerinin ve minimum inhibitör konsantrasyonun belirlenmesi aşamalarının şematik gösterimi. (<https://www.biorender.com> kullanılarak hazırlanmıştır.)

2.2.6. Disk Difüzyon Yöntemi ile Bitki Özütlerinin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

Antibakteriyel etkinlik gözlemlenemeyen bitkilere ait özütler, 9 mm steril whatman disklerine 10 mg/ml, 7.5 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde yüklenmiştir. Uygulama öncesi özütler kendi çözücüler (metanol ve etil asetat) ile çözdürülmüştür ve disklere yüklenerek çözücüler disklerden uçup, yalnızca test edilecek özütler disklerde kalana kadar steril kabinde bekletilmiştir. Bir gece önceden TSB besiyerine pasaj alınan *B. cereus* bakterisinin OD 600 nm absorbans ölçümü alındıktan sonra bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. 0.5 McFarland bakteri süspansiyonundan MHA besiyerine 100 µl eklenip yayma ekim yapılmıştır. Bakteri ekimi yapıldıktan sonra özüt yüklenen diskler zon inhibisyonunu gözlemlmek üzere besiyerine yerleştirilip, 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 30 µg/ml kanamisin diski kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında oluşan zonların yarıçapı cetvel ile ölçülmüş ve inhibisyon zonunun kaç mm olduğu belirlenmiştir (Bereksi ve ark., 2018; Danish ve ark., 2020).



Şekil 2.4. Disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi (El Guerraf ve ark., 2022)

2.2.7. Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Biyofilm İnhibisyonunun Belirlenmesi

Bitki özütlerinin, *B. cereus* üzerindeki biyofilm inhibisyonunun belirlenmesi için yapılan deneyler, 96 kuyucuklu şeffaf mikrolakalarda seri dilüsyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Biyofilm deneyleri için içerisinde %1 glikoz bulunan TSB besiyeri kullanılmıştır. Mikrolakada test ve negatif kontrol gruplarına 100 µl, kör kuyucuklarına ise 200 µl besiyeri konulmuştur. Besiyeri dağıtım işleminden sonra test edilecek özütlerden 100 µl eklenmiş ve ardından özüt ve besiyerinin homojen hale gelmesi için pipetaj yapılmıştır. Homojen hale gelen özüt+besiyeri ilk kuyucuğundan 100 µl çekilerek bir sonraki kuyuya aktarılmış ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiş olup, özütler seri dilüsyon ile 3 kat seyreltilmiştir. Böylelikle her kuyucuk bir önceki kuyucuğa göre $\frac{1}{2}$ oranında seyreltilmiştir. Uygulanan özüt konsantrasyonları, antibakteriyel deneylerin sonuçlarına göre belirlenmiş ve antibakteriyel etkinlik göstermeyen dozlar kullanılmıştır. Bir gün öncesinden büyütülen *B. cereus* bakterisinin yoğunluğu OD 0.02 olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Kör kuyucuklar hariç özüt uygulaması yapılan kuyulara ve negatif kontrol kuyularına 100 µl bakteri süspansiyonu dağıtılmıştır. Böylelikle her kuyudaki son hacim 200 µl olmuştur. Deneyler istatistiksel anlamlılık sağlanması için 7 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Mikrolakalar çalkalanmadan, 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ortamdaki planktonik bakterilerin ve besiyerinin uzaklaştırılması için

mikroplakalar, mikroplaka yıkayıcı kullanılarak fosfat buffer saline (PBS) ile üç kez yıkanmıştır. Biyofilm tabakasının fikse olması için plakalar 60 °C etüvde 1 saat boyunca kurutulmuş ve kurutma işleminden sonra plakaların her kuyusuna 225 µl %0.1'lik kristal viyole boyası eklenerek plakalar yarım saat boyunca, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilerek boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, fazla boyanın uzaklaştırılmasında plakalar üçer defa distile su ile yıkanmasının ardından 60 °C etüvde yarım saat boyunca kurutulmuştur. Biyofilmi tabakasını boyayan kristal viyole boyasını çözdürmek için her kuyuya 225 µl %33'lük glasiyal asetik asit eklenmiştir. Bakterilerin oluşturdukları biyofilm sonuçlarını ölçmek için multimod mikroplaka okuyucuda OD 590 nm'de absorbans ölçümleri alınmıştır.



Şekil 2.5. Boyanan biyofilm plakası ve multimod plaka okuyucu genel görünümü.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

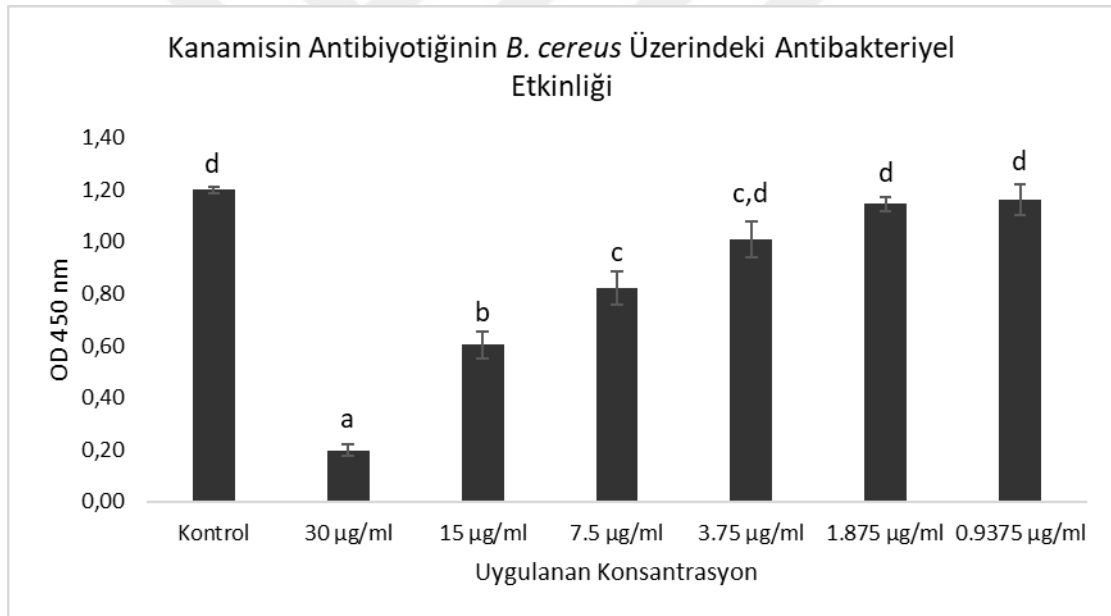
Tez çalışmasında kullanılan bitkilere ait metanol ve etil asetat özütlelerinin antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliklerinin istatistiksel anlamlılığını belirlemek amacıyla, One Way Anova – Tukey testi, IBM SPSS 26.0 programı ile gerçekleştirilmiştir. $P \leq 0.05$ anlamlılık değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel farklılıklar grafikler üzerinde farklı harfler ile belirtilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri

Centaurea kilaea, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata* subsp. *lyrata*, *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *robbiae* bitkilerinin metanol ve etil asetat özütlerinin antibakteriyel etkinlikleri belirlenmiştir. Özüt konsantrasyonları 60-16 mg/ml arasında olup *B. cereus*'a uygulanmıştır. Sonuçlar OD 450 nm'de multimod plaka okuyucuda alınmıştır. Negatif kontrole göre bitki özütlerinin inhibisyonları belirlenmiştir.

3.1.1. *B. cereus* suşuna uygulanacak antibakteriyel deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılan kanamisin antibiyotiğinin antibakteriyel etkinliği



Şekil 3.1. Kanamisin antibiyotiğinin farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.

Kanamisin antibiyotiği *B. cereus* bakterisi üzerinde 30-0.9375 µg/ml aralığında etkinliği test edilmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 30 µg/ml konsantrasyonunda diğer konsantrasyonlara oranla 83.66 ± 0.02 düzeyinde inhibisyon bulunmuştur. Azalan dilüsyonlarında ise bu oranlar % 49.79-% 3.19 aralığında bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde ise uygulanan 30 µg/ml, 15 µg/ml ve 7.5 µg/ml konsantrasyondaki kanamisinin, kontrol uygulamasına göre $p=0,000$ düzeyinde

istatistiksel olarak anlamlı inhibisyona sahip olduğu 3.75-0.9375 µg/ml konsantrasyon aralığında gözlemlenen antibakteriyel etkinliğin ise kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yaratmadığı belirlenmiştir.

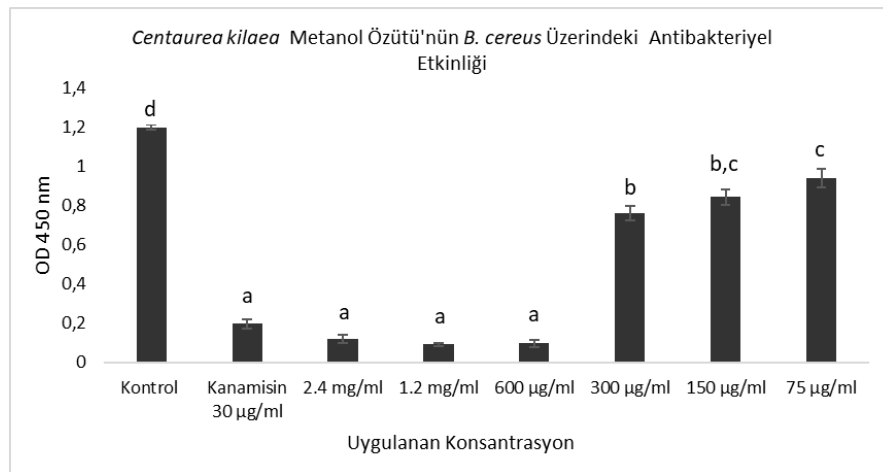
Tüm deney gruplarına ait grafiklerin sonuçları pozitif kontrol olan kanamisin grubuna göre karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.1. Kanamisinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.

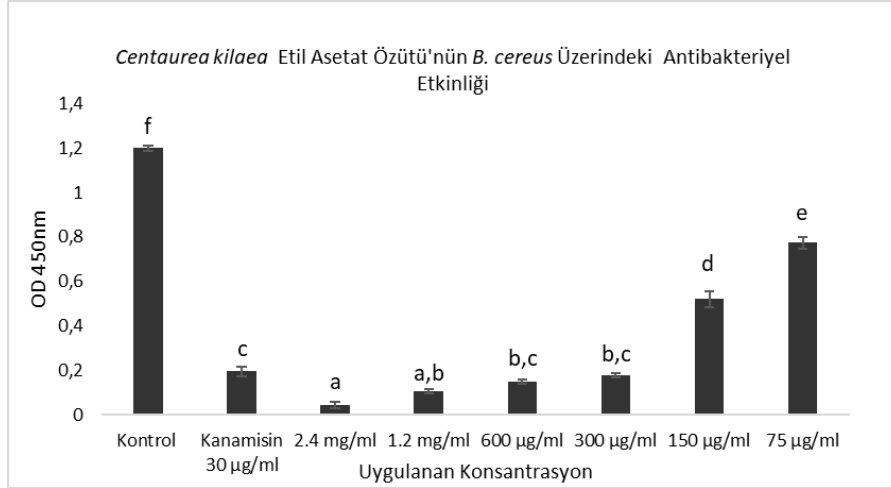
Uygulanan Konsantrasyon	Antibakteriyel İnhibisyon Yüzdesi
30 µg/ml	% 83.66 ± 0.02
15 µg/ml	% 49.79 ± 0.05
7.5 µg/ml	% 31.46 ± 0.06
3.75 µg/ml	% 15.86 ± 0.06
1.875 µg/ml	% 4.59 ± 0.02
0.9375 µg/ml	% 3.19 ± 0.05

3.1.2. *Centaurea kilaia* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri

C. kilaia bitkisinin metanol ve etil asetat özütlerinin *B. cereus* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkinliklerini tespit etmek için 2.4 mg/ml-75 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Tablo 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. *Centaurea kilaia* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.



Şekil 3.3. *Centaurea kilaea* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.

Tablo 3.2. *Centaurea kilaea* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.

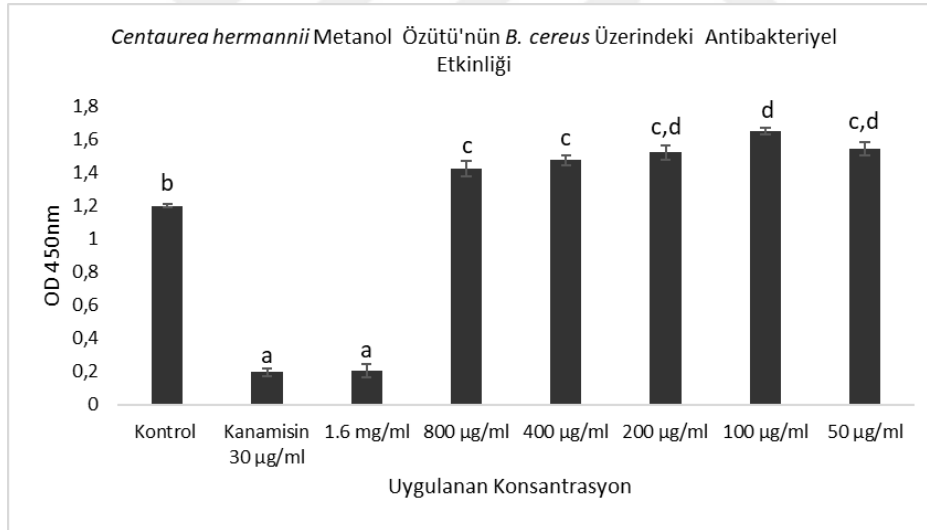
Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Antibakteriyel İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	2.4 mg/ml	% 90.04 ± 0.02
	1.2 mg/ml	% 92.42 ± 0.01
	600 µg/ml	% 91.95 ± 0.01
	300 µg/ml	% 36.54 ± 0.03
	150 µg/ml	% 29.73 ± 0.03
	75 µg/ml	% 21.72 ± 0.4
Etil Asetat	2.4 mg/ml	% 96.35 ± 0.02
	1.2 mg/ml	% 91.18 ± 0.01
	600 µg/ml	% 87.47 ± 0.01
	300 µg/ml	% 85.08 ± 0.01
	150 µg/ml	% 56.67 ± 0.04
	75 µg/ml	% 35.49 ± 0.03

Özet olarak sonuçlar incelendiğinde *C. kilaea* bitkisinin metanol ve etil asetat özütlerinin *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri 2.4 mg/ml- 75 µg/ml aralığında test edilmiştir. Metanol özütünden elde edilen sonuçlar özellikle 2.4 mg/ml, 1.2 mg/ml ve 600 µg/ml konsantrasyonlarında sırası ile %90.04, %92.42, %91.95 inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. 300-75 µg/ml aralığında ise inhibisyon değerlerinin %36.54-21.72 aralığında olduğu görülmüştür. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde ise tüm uygulama konsantrasyonlarında, kontrol grubuna göre

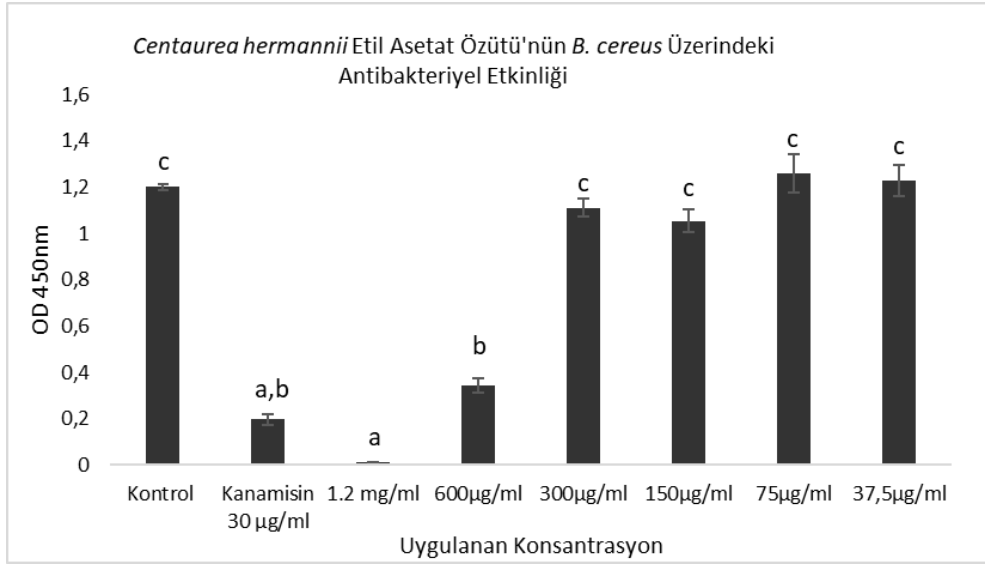
istatistiksel olarak anlamlı inhibisyonu olduğu belirlenmiştir. Etil asetat özütünün ise 2.4 mg/ml- 300 µg/ml aralığında %96.35-%85.08 oranında *B. cereus* bakterisi üzerinde yüksek oranda inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. Sırası ile 150 ve 75 µg/ml konsantrasyonunda ise %56.67 ve %35.49 oranında inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan bütün özüt konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre p=0,000 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak *C. kilea* bitkisinin *B. cereus* üzerinde gözlemlenen antibakteriyel etkinliği tüm uygulama konsantrasyonları arasında etil asetat özütünde daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

3.1.3. *Centaurea hermannii* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri

C. hermannii bitkisinin metanol ve etil asetat özütlerinin *B. cereus* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri 1.6 mg/ml-50 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Tablo 3.3 de verilmiştir.



Şekil 3.4. *Centaurea hermannii* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.



Şekil 3.5. *Centaurea hermannii* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.

Tablo 3.3. *Centaurea hermannii* *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.

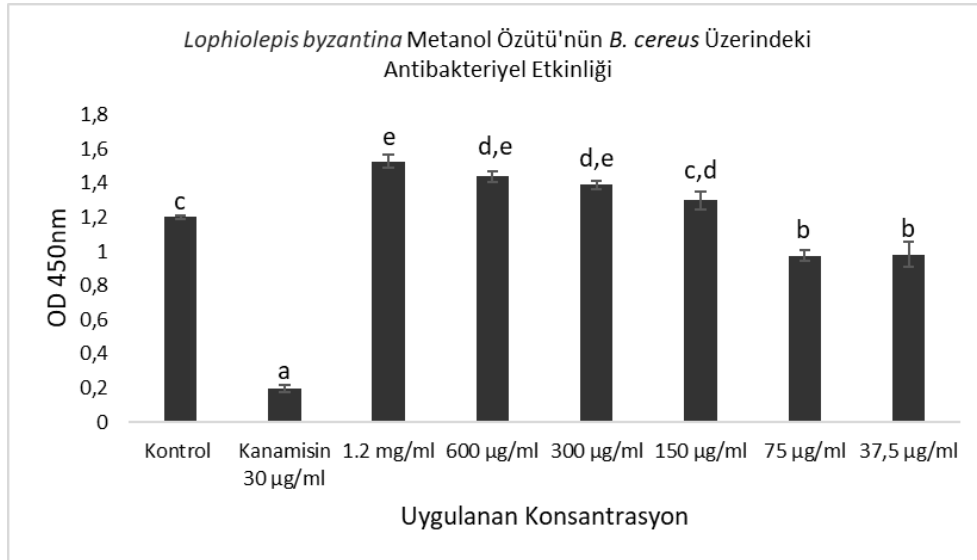
Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Antibakteriyel İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	1,6 mg/ml	% 82.89 ± 0.04
	800 µg/ml	-
	400 µg/ml	-
	200 µg/ml	-
	100 µg/ml	-
	50 µg/ml	-
Etil Asetat	1,2 mg/ml	% 99.17 ± 0.01
	600µg/ml	% 71.36 ± 0.03
	300µg/ml	% 7.49 ± 0.03
	150µg/ml	% 12.24 ± 0.05
	75µg/ml	-
	37,5µg/ml	-

C. hermannii bitkisinin metanol özütünde, yalnızca en yüksek konsantrasyon olan 1.6 mg/ml konsantrasyonunda %82.89 düzeyinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu ve 800-50 µg/ml aralığında ise herhangi bir antibakteriyel etkinliğe sahip olmadığı bulunmuştur. İstatistiksel olarak 1.6 mg/ml konsantrasyona sahip özütünde ise kontrol grubuna göre $p=0,000$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Etil asetat özütünde ise metanol özütüne göre daha düşük

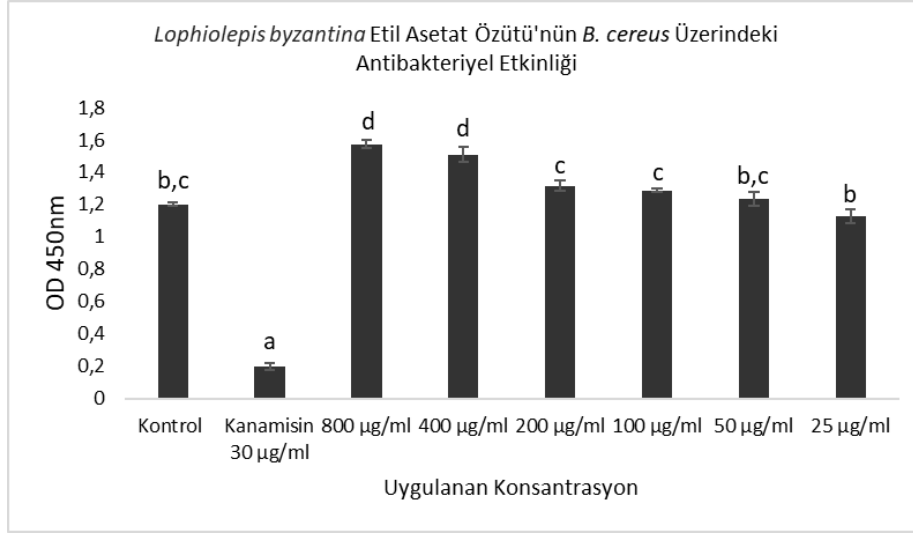
konsantrasyonlarda bile antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu özellikle 1.2 mg/ml ve 600 µg/ml konsantrasyonlarının sırası ile %99.17 ve %71.36 inhibisyon oranına sahip olduğu 300 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarının ise %7.49 ve %12.24 olarak düşük inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Uygulanan 1.2 mg/ml, 600 µg/ml konsantrasyondaki özütlerin, kontrol grubuna göre p=0,000 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı inhibisyonu olduğu diğer konsantrasyonlarında ise, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak *C. kilea* bitkisine benzer olarak *C. hermannii* bitkisinin de etil asetat özütünün *B. cereus* bakterisi üzerinde antibakteriyel etkinliğinin daha iyi sonuçlara sahip olduğu görülmektedir.

3.1.4. *Lophiolepis byzantina* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri

Lophiolepis byzantina bitkisinin *B. cereus* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri metanol özütleri için 1.2 mg/ml-37.5 µg/ml aralığında, etil asetat özütleri için ise 800-25 µg/ml aralığında test edilmiştir. *L. byzantina* bitkisine ait antibakteriyel sonuçlar sırası ile Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Tablo 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.6. *Lophiolepis byzantina* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.



Şekil 3.7. *Lophiolepis byzantina* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.

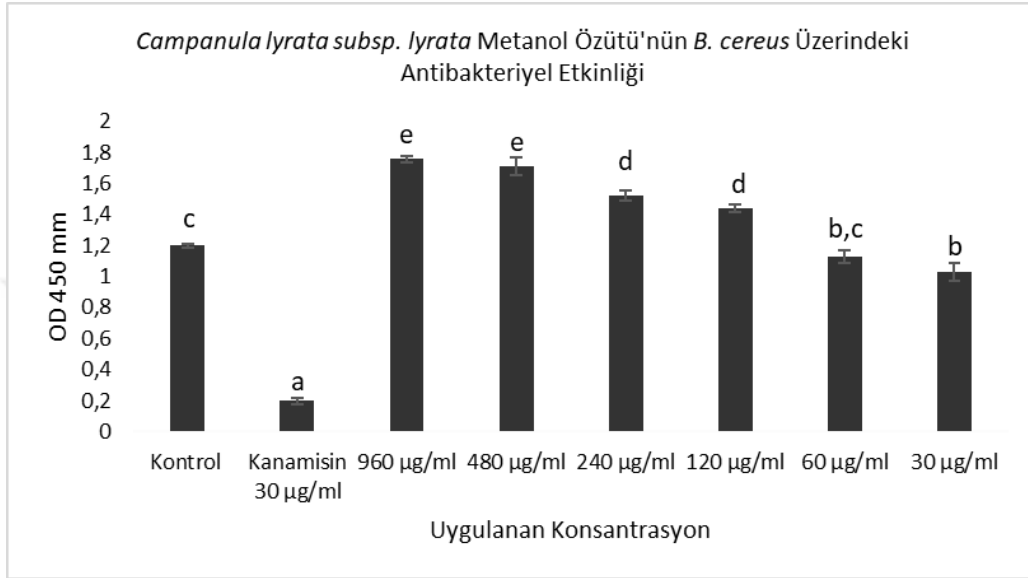
Tablo 3.4. *Lophiolepis byzantina* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Antibakteriyel İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	1,2 mg/ml	-
	600 µg/ml	-
	300 µg/ml	-
	150 µg/ml	-
	75 µg/ml	% 18.78 ± 0.03
	37,5 µg/ml	% 18.16 ± 0.07
Etil Asetat	800 µg/ml	-
	400 µg/ml	-
	200 µg/ml	-
	100 µg/ml	-
	50 µg/ml	-
	25 µg/ml	% 5.86 ± 0.04

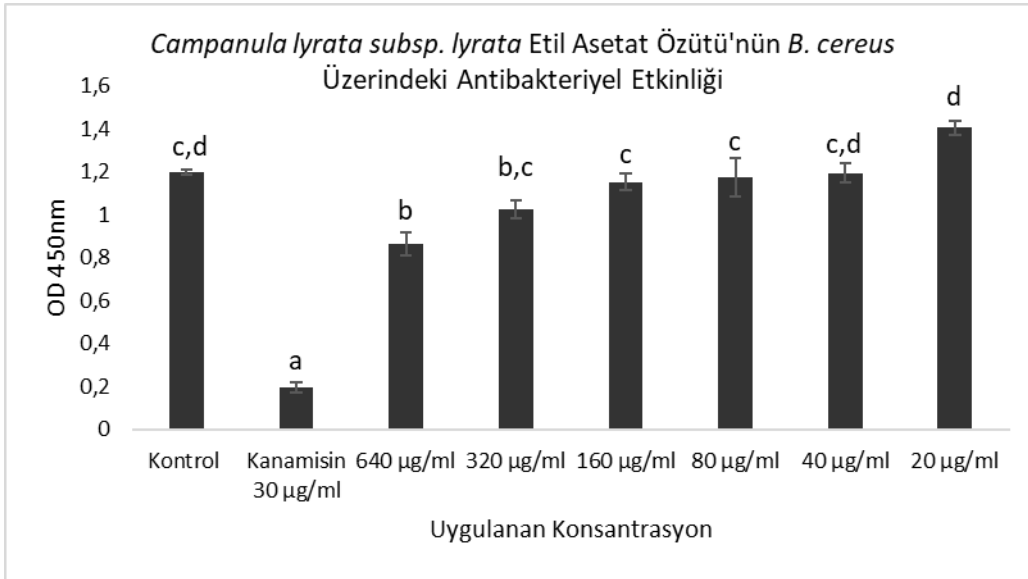
L. byzantina bitkisinin metanol ve etil asetat özütlerine ait sonuçlar incelendiğinde antibakteriyel etkinliklerinin her iki grup içinde oldukça düşük olduğu görülmektedir. Metanol özütlerinde 1.2 mg/ml- 150 µg/ml aralığında herhangi bir etkinliğe rastlanmazken düşük konsantrasyon olan 75 ve 37.5 µg/ml'de %18 düzeyinde düşük inhibisyon gözlemlenmiştir. Benzer olarak etil asetat özütlerinde de sadece en düşük konsantrasyon olan 25 µg/ml' de %5.86 olarak oldukça düşük inhibisyon aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde ise antibakteriyel etkinlik açısından anlamlı bulunmamıştır.

3.1.5. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri

Campanula lyrata subsp. *lyrata* bitkisine ait metanol özütü 960-30 µg/ml aralığında, etil asetat özütünün ise 640-20 µg/ml aralığında antibakteriyel etkinlikleri test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Tablo 3.5’ de verilmiştir.



Şekil 3.8. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.



Şekil 3.9. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.

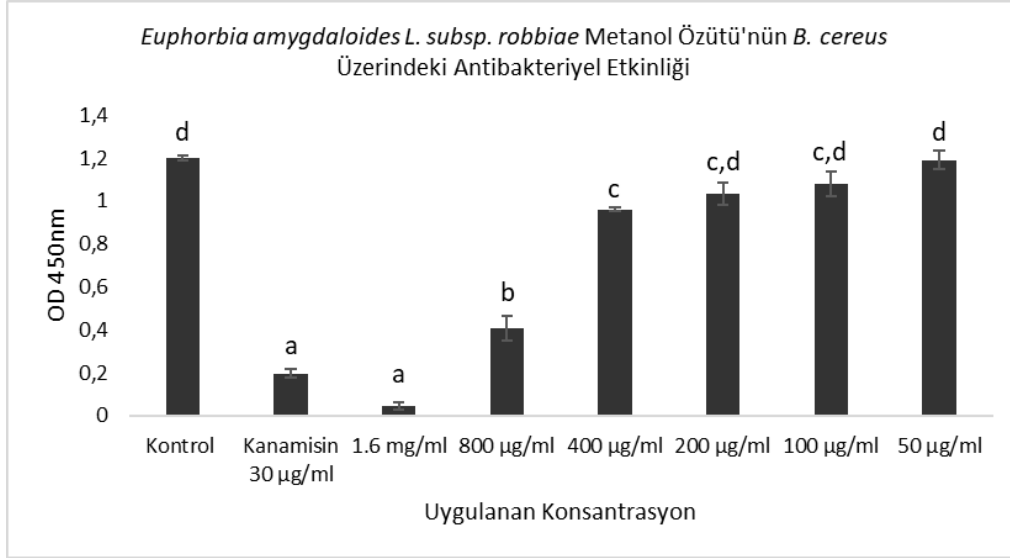
Tablo 3.5. *Campanula lyrata subsp. lyrata* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Antibakteriyel İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	960 µg/ml	-
	480 µg/ml	-
	240 µg/ml	-
	120 µg/ml	-
	60 µg/ml	% 6.10 ± 0.04
	30 µg/ml	% 14.25 ± 0.05
Etil Asetat	640 µg/ml	% 27.96 ± 0.05
	320 µg/ml	% 14.72 ± 0.04
	160 µg/ml	% 4.02 ± 0.03
	80 µg/ml	% 2.20 ± 0.1
	40 µg/ml	% 0.4 ± 0.5
	20 µg/ml	-

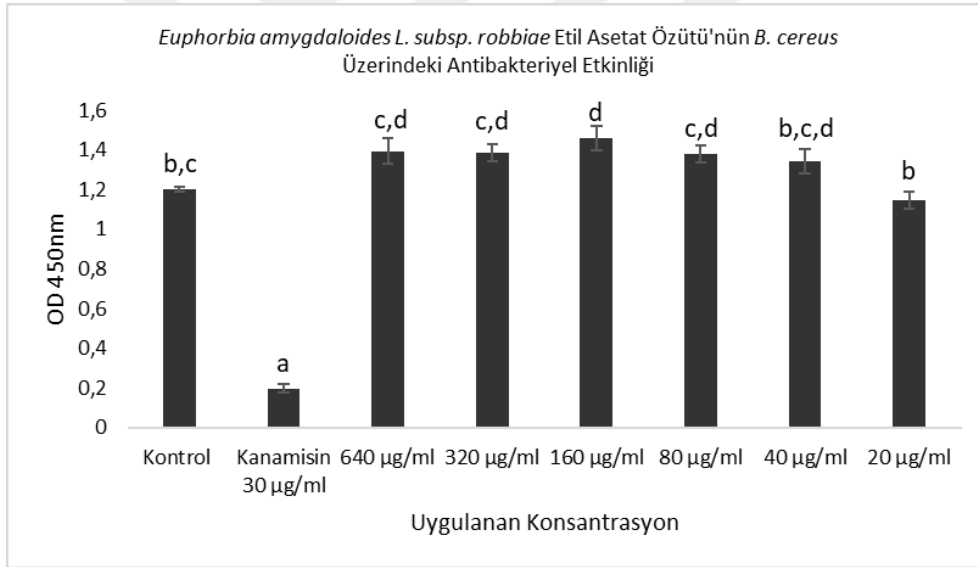
C. lyrata subsp. lyrata bitkisinin metanol özütünün, yalnızca uygulanan 60 µg/ml (%6.1) ve 30 µg/ml (%14.25) konsantrasyonlarında düşükte olsa *B. cereus* bakterisi üzerinde antibakteriyel inhibisyon aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Etil asetat özütlerinin ise 640-40 µg/ml aralığında %27.96-%0.4 aralığında düşük inhibisyon aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. *C. lyrata subsp. lyrata* bitkisine ait en yüksek antibakteriyel etkinlik 640 µg/ml konsantrasyonunda etil asetat özütünde bulunmuştur. Uygulanan 640 µg/ml konsantrasyondaki özütün kontrol grubuna göre $p=0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.

3.1.6. *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri

Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae bitkisinin metanol özütleri 1.6 mg/ml-50 µg/ml aralığında, etil asetat özütleri ise 640-20 µg/ml aralığında test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Tablo 3.6' de verilmiştir.



Şekil 3.10. *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *robbiae* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.



Şekil 3.11. *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *robbiae* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel etkinlik grafiği.

Tablo 3.6. *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibakteriyel etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Antibakteriyel İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	1,6 mg/ml	% 96.25 $\pm$ 0.01
	800 μ g/ml	% 66.23 $\pm$ 0.05
	400 μ g/ml	% 20.01 $\pm$ 0.01
	200 μ g/ml	% 13.91 $\pm$ 0.04
	100 μ g/ml	% 10.03 $\pm$ 0.05
	50 μ g/ml	% 0.77 $\pm$ 0.04
Etil Asetat	640 μ g/ml	-
	320 μ g/ml	-
	160 μ g/ml	-
	80 μ g/ml	-
	40 μ g/ml	-
	20 μ g/ml	% 4.39 $\pm$ 0.04

E. amygdaloides L. subsp. robbiae bitkisinin metanol özütünün *B. cereus* bakterisi üzerindeki en yüksek inhibisyon değerleri %96.25, %66.23, %20.01 ile 1.6 mg/ml, 800 ve 400 μ g/ml konsantrasyonlarında bulunmuştur. 200-50 μ g/ml konsantrasyonlarındaki inhibisyon aktiviteleri ise %13.91-0.77 oranlarında düşük olarak tespit edilmiştir. 1,6 mg/ml, 800 μ g/ml ve 400 μ g/ml konsantrasyondaki özütlerinin, kontrol grubuna göre $p=0,000$ ve $p=0,002$ arasında istatistiksel olarak anlamlı inhibisyonu olduğu belirlenmiştir. Etil asetat özütünün ise yalnızca 20 μ g/ml konsantrasyonunda %4.39 inhibisyon olduğu ve diğer konsantrasyonlarında ise herhangi bir inhibisyon olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak *E. amygdaloides L. subsp. robbiae* bitkisinin metanol özütünün, *B. cereus* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin etil asetat özütüne göre oldukça yüksek olduğu bulunmuştur.

3.2. Bitki Özütlerinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

B. cereus bakterisine ait üremenin engellediği en düşük konsantrasyonunun belirlenmesi için, her bitki özütüne ait antibakteriyel etkinlik (Bulgular 3.1) sonuçlarına göre farklı aralıklarda konsantrasyonları denenmiştir. Negatif kontrol ve pozitif kontrol grubuna ait sonuçlara göre özütlerin minimum inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir. Her bitkiye ait MİK dozu sonuçları Tablo 3.7' de verilmiştir.

Tablo 3.7. Bitki özütlerinin *B. cereus* üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyonu.

Bitkiler	Çözücü	MİK	İnhibisyon Yüzdesi
<i>Centaurea kilaea</i>	Metanol	500 µg/ml	% 94 ± 0.03
<i>Centaurea kilaea</i>	Etil Asetat	400 µg/ml	% 88.57 ± 0.04
<i>Centaurea hermannii</i>	Metanol	1.5 mg/ml	% 92.03 ± 0.07
<i>Centaurea hermannii</i>	Etil Asetat	700 µg/ml	% 88.08 ± 0.03
<i>Lophiolepis byzantina</i>	Metanol	-	-
<i>Lophiolepis byzantina</i>	Etil Asetat	-	-
<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i>	Metanol	-	-
<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i>	Etil Asetat	-	-
<i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i>	Metanol	900 µg/ml	% 95.68 ± 0.02
<i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i>	Etil Asetat	-	-

Sonuç olarak, *C. kilaea* bitkisinin metanol özütüne ait MİK dozu %94 inhibisyon oranı ile 500 µg/ml, etil asetat özütünde ise %88.57 inhibisyon değeri ile 400 µg/ml olarak bulunmuştur. *C. hermannii* bitkisinde ise metanol özütünde 1.5 mg/ml konsantrasyonda %92.03 ve etil asetat özütünde ise 700 µg/ml konsantrasyonda %88.08 inhibisyon oranında MİK değerleri bulunmuştur. *L. byzantina*, *C. lyrata subsp. lyrata* bitkilerinin metanol ve etil asetat özütlerinde antibakteriyel etkinliğe rastlanmadığı için MİK değerleri de bulunmamıştır. *E. amygdaloides L. subsp. robbiae* bitkisinde ise yalnızca metanol özütünde %95.68 inhibisyon oranı ile 900 µg/ml konsantrasyonda MİK değeri bulunmuştur.

3.3. Bitki Özütlerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile İnhibisyon Zonlarının Belirlenmesi

Test bitkilerine ait metanol ve etil asetat özütleri steril whatman disklerine 10-2.5 mg/ml konsantrasyonlarında yüklenmiştir. *B. cereus* bakterisi yayma ekim yöntemi ile ekildikten sonra özütler ile yüklenmiş diskler petri ler üzerine eklenerek antibakteriyel etkinlikleri test edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra özütlerin antibakteriyel inhibisyon zonları cetvel ile ölçülüp inhibisyon zonları belirlenmiştir. İnhibisyon zonlarına ait bulgular Tablo 3.8’de sunulmuştur.

Tablo 3.8. Bitki özütlerinin inhibisyon zonları.

Bitkiler	Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon			
		10 mg/ml	7.5 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml
<i>Lophiolepis byzantina</i>	Metanol	-	-	-	-
<i>Lophiolepis byzantina</i>	Etil Asetat	11 mm $\pm$ 0.3	11 mm $\pm$ 0.4	-	-
<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i>	Metanol	-	-	-	-
<i>Campanula lyrata subsp. lyrata</i>	Etil Asetat	-	-	-	-
<i>Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae</i>	Etil Asetat	-	-	-	-

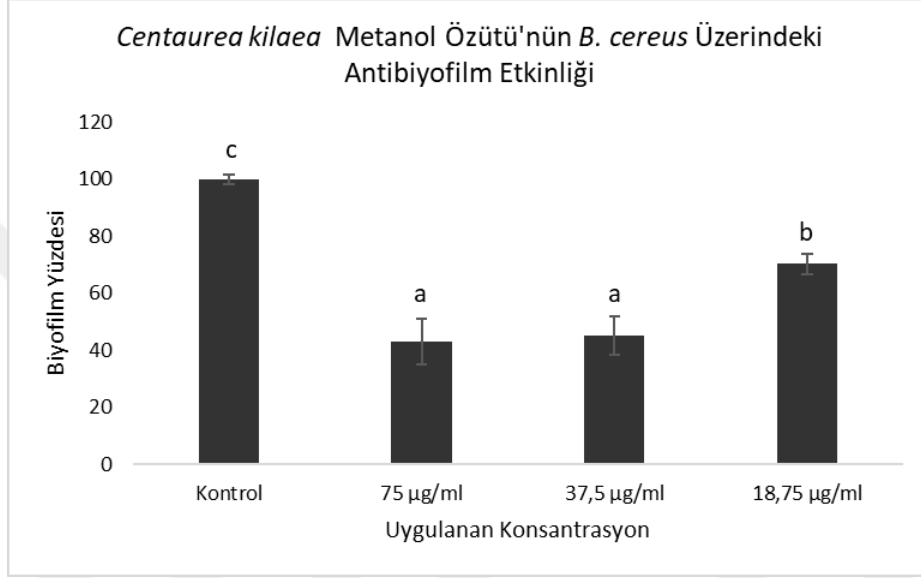
Pozitif kontrol olarak kullanılan kanamisin antibiyotiği, minimum inhibitör konsantrasyonu olan 30 μ g/ml konsantrasyonunda diske yüklenmiştir. Kanamisin diskinin *B. cereus* üzerindeki inhibisyon zonu 21 $\pm$ 0.2 mm olarak ölçülmüştür. *L. byzantina* bitkisine ait etil asetat özütünün yalnızca 10 ve 7.5 mg/ml konsantrasyonlarında 11 mm etkinlik gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol ile kıyaslandığında *L. byzantina* bitkisine ait etil asetat özütünün çok düşük antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Uygulama yapılan diğer bitki özütlerinin, disk difüzyon yöntemi ile de antibakteriyel etkinliği bulunamamıştır.

3.4. Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Biyofilm İnhibisyonun Belirlenmesi

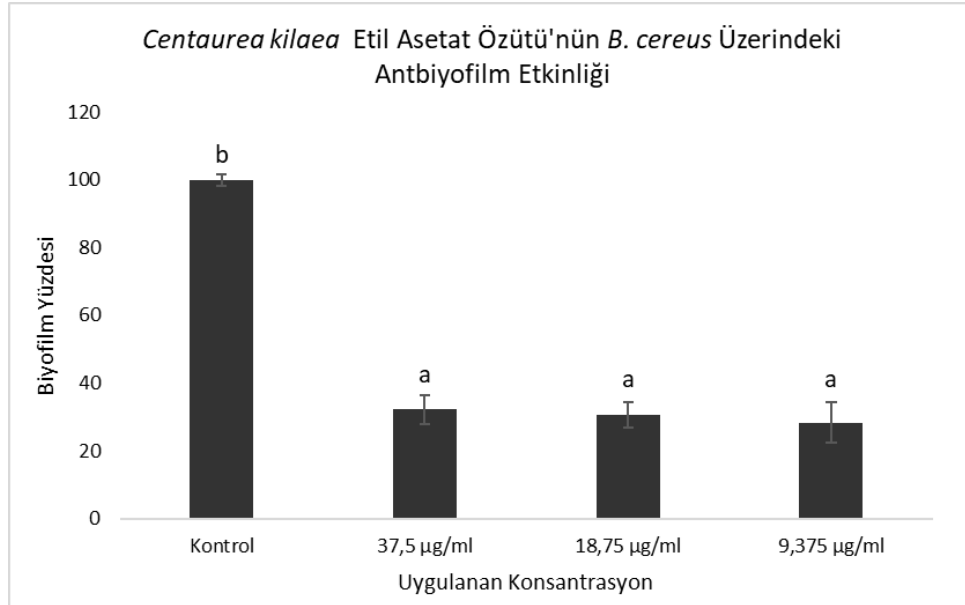
Centaurea kilaia, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata subsp. lyrata*, *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* bitkilerinin, metanol ve etil asetat özütlerinin antibakteriyel etkinlikleri belirlendikten sonra antibakteriyel etkileri olmayan konsantrasyonlar *B. cereus*'a uygulanmıştır. Etkinliği olan konsantrasyonlar negatif kontrolle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bakterilerin oluşturdukları biyofilm yapılarının kantitatif olarak ölçülmesi için multimod mikropilok okuyucuda OD 590 nm'de absorbans ölçümleri alınmıştır.

3.4.1. *Centaurea kilaia* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri

C. kilaia bitkisinin *B. cereus* bakterisi üzerindeki antibiyofilm etkinliği metanol özütlerinde 75, 37.5 ve 18.75 µg/ml, etil asetat özütlerinde ise 37.5, 18.75 ve 9.375 µg/ml konsantrasyonların etkinlikleri test edilmiştir. Antibiyofilm inhibisyon yüzdesine ait sonuçlar Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Tablo 3.9' da verilmiştir.



Şekil 3.12. *Centaurea kilaia* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.



Şekil 3.13. *Centaurea kilaia* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.

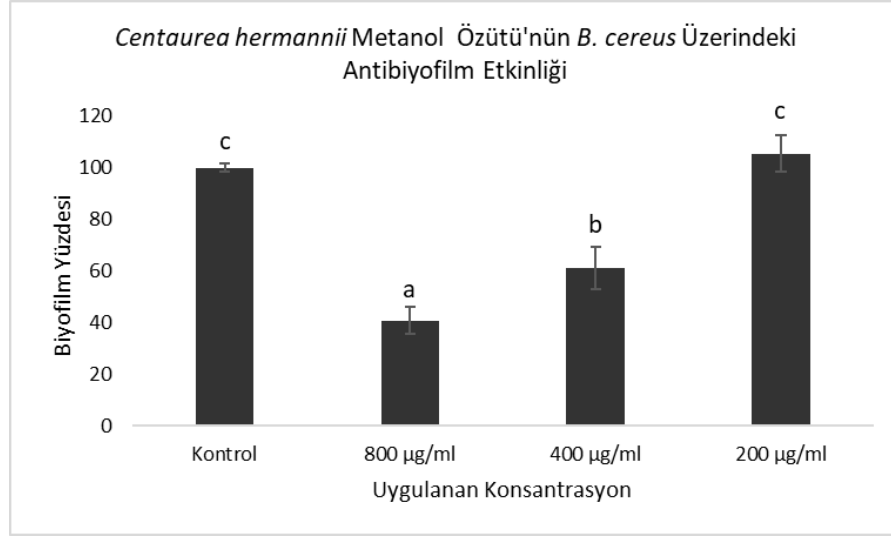
Tablo 3.9. *Centaurea kilaia* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Biyofilm İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	75 µg/ml	% 59.96 ± 0.15
	37,5 µg/ml	% 54.94 ± 0.13
	18,75 µg/ml	% 29.71 ± 0.07
Etil Asetat	37,5 µg/ml	% 67.85 ± 0.08
	18,75 µg/ml	% 69.35 ± 0.07
	9,375 µg/ml	% 71.70 ± 0.11

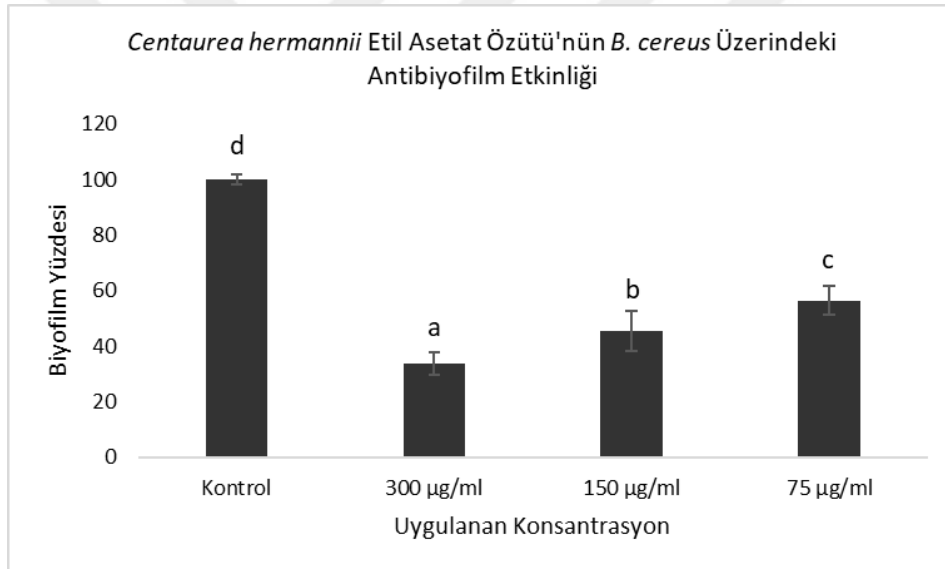
C. kilaia bitkisine ait metanol ve etil asetat özütlerinin sonuçları incelendiğinde, metanol özütlerinin 75 µg/ml ve 37.5 µg/ml konsantrasyonlarının biyofilm inhibisyon yüzdeleri sırası ile %59.96 ve %54.94 olarak bulunurken, 18.75 µg/ml konsantrasyonun ise %29.71 olduğu bulunmuştur. Uygulanan bütün özüt konsantrasyonlarının, kontrol grubuna göre $p=0,000$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı biyofilm inhibisyonu olduğu belirlenmiştir. Etil asetat özütlerinin 37.5 µg/ml konsantrasyonunda %67.85, 18.75 µg/ml %69.35 ve 9.375 µg/ml konsantrasyonunda ise %71.7 biyofilm inhibisyonuna sahip olduğu bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak $p=0,000$ düzeyinde anlamlı bir farkla biyofilmi inhibe ettiğini göstermektedir. *C. kilaia* bitkisinin antibakteriyel etkinliğine benzer olarak antibiyofilm etkinliğinde de etil asetat çözücüsünün daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

3.4.2. *Centaurea hermannii* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri

C. hermannii bitkisinin antibiyofilm etkinlikleri, metanol özütü için 800-200 µg/ml aralığında, etil asetat özütü için ise 300-75 µg/ml aralığında test edilmiştir. Biyofilm inhibisyon yüzdelere ait sonuçlar Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Tablo 3.10'da gösterilmektedir.



Şekil 3.14. *Centaurea hermannii* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyo-film etkinlik grafiği.



Şekil 3.15. *Centaurea hermannii* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyo-film etkinlik grafiği.

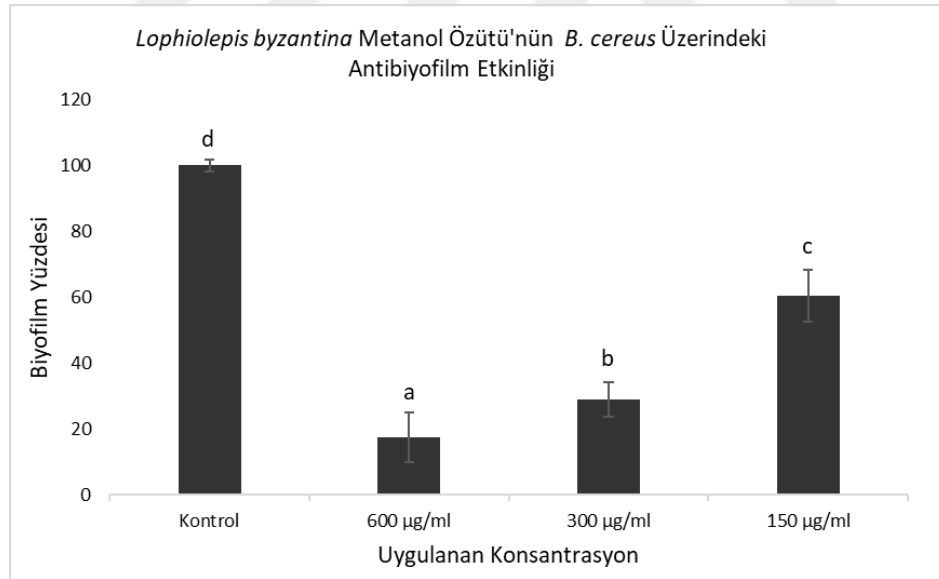
Tablo 3.10. *Centaurea hermannii* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibiyo-film etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Biyofilm İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	800 µg/ml	% 59.14 ± 0.1
	400 µg/ml	% 38.74 ± 0.16
	200 µg/ml	-
Etil Asetat	300 µg/ml	% 66.22 ± 0.08
	150 µg/ml	% 54.40 ± 0.14
	75 µg/ml	% 43.58 ± 0.1

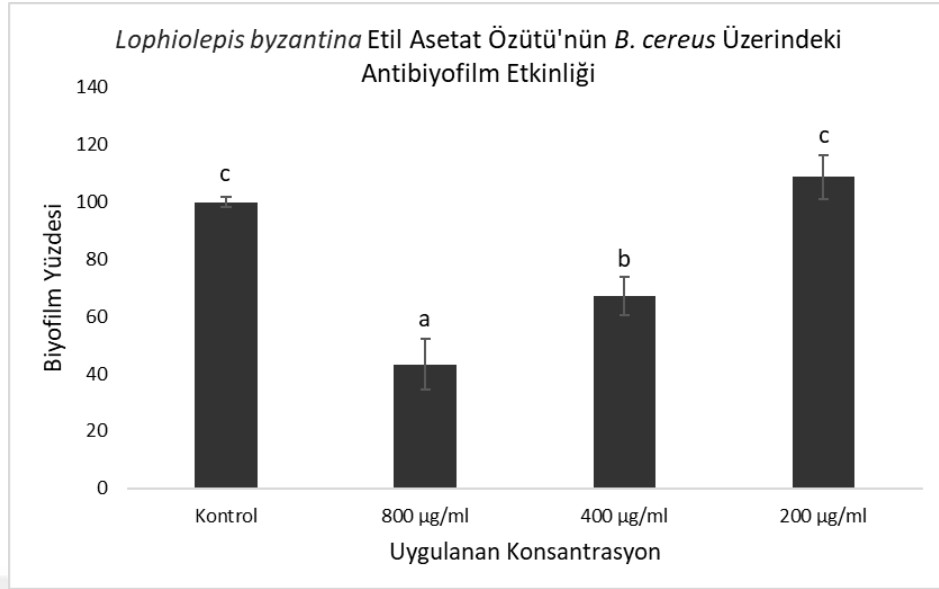
B. cereus bakterisi üzerinde *C. hermannii* bitkisine ait metanol ve etil asetat özütlerinin biyofilm inhibisyon yüzdeleri incelendiğinde, metanol özütlerinin 800 ve 400 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %59.14 ve %38.74 oranında inhibisyona sahip olduğu ve bu iki konsantrasyona ait sonuçların kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan $p=0.000$ düzeyinde anlamlı bir farka sahip olduğu görülmüştür. Etil asetat özütünde ise 300 µg/ml konsantrasyonda %66.22, 150 µg/ml konsantrasyonda %54.40 ve 75 µg/ml konsantrasyonda ise %43.58 inhibisyona sahip olduğu ve kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre etil asetat özütü, metanol özütüne göre daha düşük konsantrasyonlarda yüksek antibiyofilm özellik göstermektedir.

3.4.3. *Lophiolepis byzantina* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri

Lophiolepis byzantina bitkisine ait metanol (600-150 µg/ml) ve etil asetat (800-200 µg/ml) özütlerinin biyofilm inhibisyon sonuçları Şekil 3.16, Şekil 3.17 ve Tablo 3.11.' de verilmiştir.



Şekil 3.16. *Lophiolepis byzantina* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.



Şekil 3.17. *Lophiolepis byzantina* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.

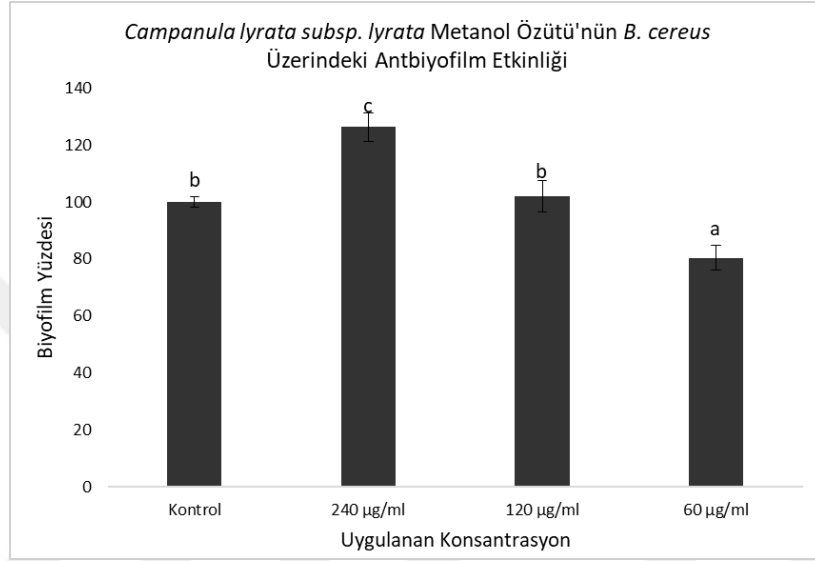
Tablo 3.11. *Lophiolepis byzantina* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Biyofilm İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	600 µg/ml	% 82.44 ± 0.15
	300 µg/ml	% 71.03 ± 0.1
	150 µg/ml	% 39.62 ± 0.15
Etil Asetat	800 µg/ml	% 56.68 ± 0.17
	400 µg/ml	% 32.77 ± 0.13
	200 µg/ml	-

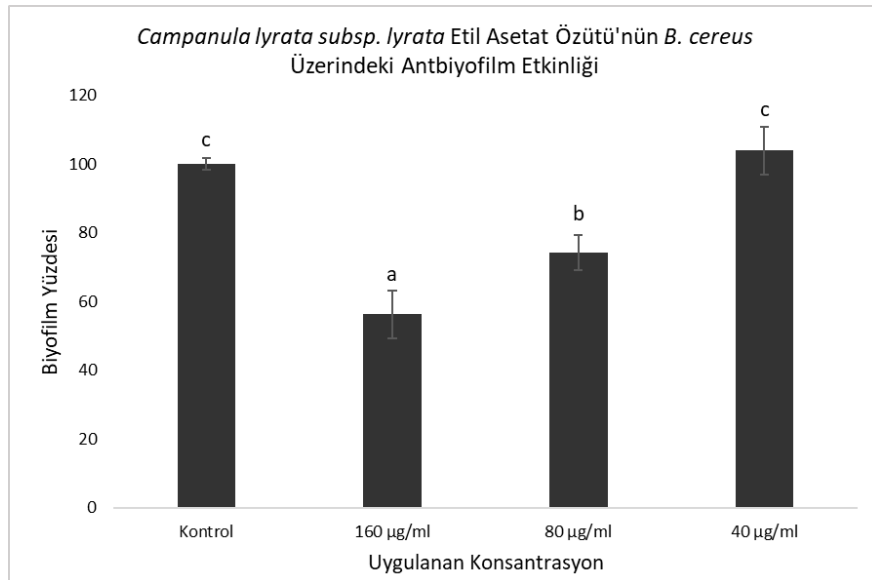
L. byzantina bitkisine ait metanol özütünün 600 µg/ml, 300 µg/ml ve 150 µg/ml konsantrasyonlarına ait biyofilm inhibisyon yüzdeleri sırası ile %82.44, %71.03 ve %39.62 olarak bulunmuştur. Bütün uygulama konsantrasyonları kontrole göre $p=0.000$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Etil asetat özütüne ait ise 800 µg/ml %56.68 ve 400 µg/ml konsantrasyonun ise %32.77 inhibisyon aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Etil asetat özütüne ait 800 ve 400 µg/ml konsantrasyonları kontrol grubuna göre biyofilm inhibisyon etkinlikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde metanol özütünün, etil asetat özütüne göre daha iyi antibiyofilm etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

3.4.4. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri

Campanula lyrata subsp. *lyrata* bitkisine ait metanol özütlerinin konsantrasyonları 240, 120 ve 60 µg/ml, etil asetat özütlerinin ise 160, 80 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarına ait biyofilm inhibisyon sonuçları Şekil 3.18, Şekil 3.19 ve Tablo 3.12’de gösterilmektedir.



Şekil 3.18. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.



Şekil 3.19. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.

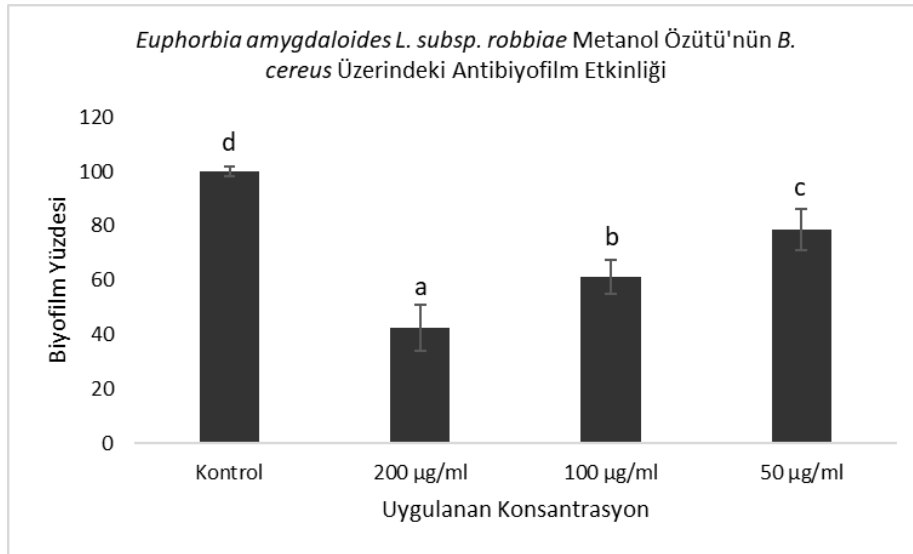
Tablo 3.12. *Campanula lyrata subsp. lyrata* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Biyofilm İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	240 µg/ml	-
	120 µg/ml	-
	60 µg/ml	% 19.57 ± 0.08
Etil Asetat	160 µg/ml	% 43.78 ± 0.13
	80 µg/ml	% 25.86 ± 0.1
	40 µg/ml	-

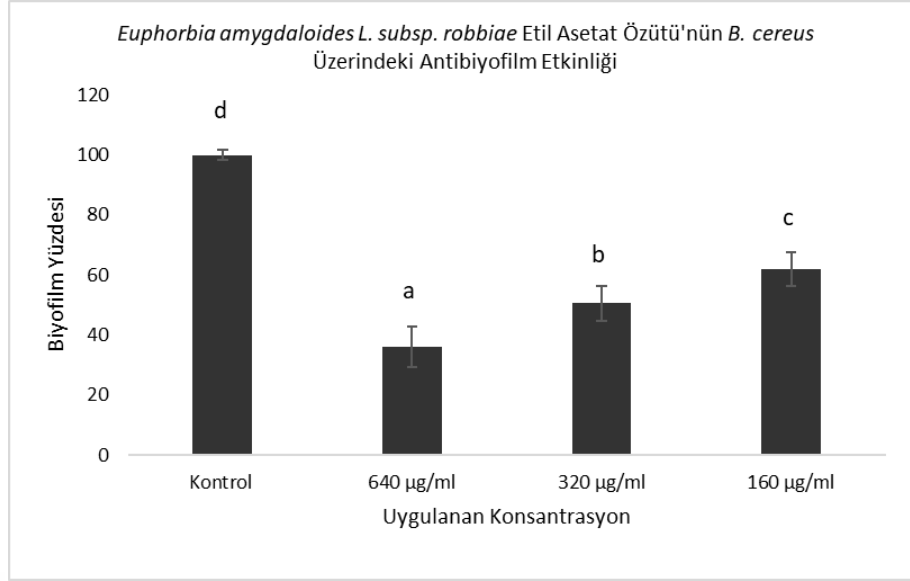
Campanula lyrata subsp. lyrata bitkisinin metanol özütüne ait yalnızca en düşük 60 µg/ml konsantrasyonunda %19.57 biyofilm inhibisyonu gözlemlenmiştir. Etil asetat özütünde ise 160 µg/ml konsantrasyonda %43.78, 80 µg/ml konsantrasyonda ise %25.86 oranında biyofilm inhibisyonu gözlemlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak fark bulunmuştur ($p=0.000$, Şekil 3.18).

3.4.5. *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* Bitki Özütlerinin *B. cereus* Üzerindeki Antibiyofilm Etkinlikleri

Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae bitkisinin metanol özütlerinin 200, 100, 50 µg/ml konsantrasyonlarda, etil asetat özütünün ise 640, 320, 160 µg/ml konsantrasyonlardaki biyofilm inhibisyon yüzdeleri Şekil 3.20, Şekil 3.21 ve Tablo 3.13' de gösterilmiştir.



Şekil 3.20. *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* metanol özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafik.



Şekil 3.21. *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* etil asetat özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. cereus* üzerindeki antibiyofilm etkinlik grafiği.

Tablo 3.13. *Euphorbia amygdaloides L. subsp. robbiae* özütlerinin *B. cereus*'a uygulanan konsantrasyonları ve antibiyofilm etkinlikleri.

Çözücü	Uygulanan Konsantrasyon	Biyofilm İnhibisyon Yüzdesi
Metanol	200 µg/ml	% 57.62 ± 0.17
	100 µg/ml	% 38.65 ± 0.12
	50 µg/ml	% 21.54 ± 0.15
Etil Asetat	640 µg/ml	% 63.98 ± 0.13
	320 µg/ml	% 49.44 ± 0.11
	160 µg/ml	% 38.08 ± 0.11

B. cereus bakterisi üzerine *E. amygdaloides L. subsp. robbiae* bitkisinin metanol özütlerinde azalan konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm inhibisyon oranları sırası ile %57.62, %38.65, %21.54 olarak bulunmuştur. Uygulama konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre istatistiksel sonuçları incelendiğinde ise $p=0.000$ düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 3.20). Etil asetat özütlerinde de metanol özütlerine benzer olarak 640 µg/ml konsantrasyonda %63.98, 320 µg/ml'de %49.44 ve 160 µg/ml'de ise %38.08 biyofilm inhibisyonuna sahip olduğu görülmüş ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.21).

4. TARTIŞMA

Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede, antibiyotiklerin serbest ve çoğunlukla bilinçsiz şekilde kullanımı sonucunda bakterilerde antibiyotik direnci endişe verici oranlarda artmaktadır (Velez ve Sloand, 2016). Bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direnci, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmasından kaynaklı küresel bir sorun haline gelmiştir. Gram Pozitif ve Gram Negatif bakterilerdeki çoklu ilaca dirençli suşların geleneksel ilaçlar ile tedavi edilmesi zor hatta, tedavi edilemeyen enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (Frieri ve ark., 2017). Özellikle bakterilerin oluşturduğu biyofilm formunun antibiyotiklere karşı daha da dirençli olması küresel anlamda ciddi bir sorun olarak kabul edilmektedir (Ribeiro ve ark., 2016). Artan antibiyotik direncini azaltmak ve önlemek için yeni tedavilerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar artmıştır (MacGowan ve Macnaughton, 2017).

Bilinen ve tedavi edici olarak kullanılan sentetik ilaçların insan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle, doğal materyallerden elde edilebilecek yeni ilaç etken maddelerinin arayışına ihtiyaç duyulmaktadır. Dünyada kullanılan ilaç etken maddelerinin pek çoğu bitkilerden elde edilmektedir (Kozłowska ve ark., 2022). Geniş yayılım gösteren ve birçok ortamda bulunan bitki türleri daha yoğun olarak uzun yıllardır araştırılmış ve etkinlikleri tespit edilmiştir. Fakat yeni ilaç etken maddelerinin keşfine dönük son yıllarda yapılan çalışmalar daha çok likenler, mantarlar ve endemik bitkilerde sürdürülmektedir. Ülkemiz, üç kıtanın kesiştiği noktada bulunması ve farklı iklim tiplerinin görülmesi sebebiyle hem biyoçeşitlilik hem de biyoçeşitlilikte endemizm oranı bakımından bütün Avrupa kıtası ile karşılaştırılabilir durumdadır.

Bu bilgiler ışığında, tez çalışması kapsamında Türkiye'ye endemik olan ve potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülen, *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata subsp. lyrata* ve *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* bitkilerinin, *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlikleri belirlenmiştir.

Şen ve arkadaşları, içlerinde *Centaurea kilaea*'nın da bulunduğu beş farklı *Centaurea* türünün antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini test etmişlerdir. *C. kilaea*'nın, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkinliğinin, *Candida albicans* üzerinde ise antifungal etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (Şen ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, *Centaurea furfuracea* metanol özütünün *B. cereus*

bakterisinde 50 mg/ml konsantrasyonunu MİK değerine sahip olduğunu saptamışlardır. (Chemsal ve ark., 2018). Benzer olarak farklı bir çalışmada kullanılan *C. kilaea* ve diğer *Centaurea* türlerinin antioksidan özelliklerinin, pozitif kontrol olarak kullandıkları askorbik asitten daha iyi olduğunu ve total fenolik bileşik miktarlarının birbirlerine yakın olduğunu gözlemlemişlerdir (Sekerler ve ark., 2018). Yapılan diğer bir çalışmada *C. hermannii* bitki özütünün antifungal etkinliğinin yüksek olduğu, *Staphylococcus aureus* üzerinde ise düşük de olsa antibakteriyel etkinliğinin olduğu raporlanmıştır (Sür-Altiner ve ark., 1997). Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda *C. kilaea*'nın metanol ve etil asetat özütlerinin *B. cereus* üzerinde antibakteriyel etkinliğinin yüksek olduğu bulunmuştur. Uygulanan metanol özütünden 2.4 mg/ml, 1.2 mg/ml ve 600 µg/ml konsantrasyonlarının sırası ile 90.04 ± 0.02 , 92.42 ± 0.01 , 91.95 ± 0.02 bakteriyel inhibisyonu tespit edilmiştir. Etil Asetat özütünün ise 2.4 mg/ml- 300 µg/ml aralığında 96.35 -% 85.08 oranında *B. cereus* bakterisi üzerinde yüksek oranda inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. *C. hermannii* bitkisinin ise metanol özütünde yalnızca en yüksek konsantrasyon olan 1.6 mg/ml konsantrasyonda 82.89 ± 0.04 düzeyinde antibakteriyel etkinlik, etil asetat özütünde ise 1.2 mg/ml-600 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla 99.17 ± 0.01 ve 71.36 ± 0.03 antibakteriyel etkinlik tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürle benzerlik göstermekle birlikte, literatürde kullanılan özüt konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tez çalışmasında kullanılan *C. kilaea* bitkisi için metanol ve etil asetat çözücüsünün etkinliğinin benzer olduğu fakat *C. hermannii* bitkisinde ise etil asetat özütünün daha etkili olması kullanılan çözücülerinin polaritelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Antibakteriyel etkinliklerine benzer olarak antibiyofilm aktiviteleri incelendiğinde ise, yapılan bir çalışma sonucunda *C. kilaea*'dan salvigenin, pectolinarigenin, jaceosidin flavonoidleri izole edilmiştir (Salan ve Öksüz, 2001). Kısa ve arkadaşları *C. kilaea* bitkisinin kateşin, klorojenik asit, gentisik asit, vanilik asit, kumarik asit ve naringenin gibi sekonder metabolitleri içerdiğini HPLC yöntemi ile raporlamışlardır (Kısa ve ark., 2023). Chemsal ve arkadaşları 2018 yılında yaptığı çalışmada, *Centaurea* cinsine ait *Centaurea furfuracea* bitkisinin metanol özütünün, kimyasal bileşenlerini, antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliğini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda *C. furfuracea* metanol özütünün, uygulanan 25 mg/ml

konsantrasyonun *B. cereus* biyofilmini %72.34 inhibe ettiğini saptamışlardır (Chemsu ve ark., 2018). Yürütülen bir diğer çalışmada ise *Centaurea ensiformis* özütlerinin *Escherichia coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin oluşturduğu biyofilm formunda inhibisyona sahip olduğunu bildirmişlerdir (Boncooğlu ve ark., 2024). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen verilere göre, *C. kilaea* bitkisinin metanol ve etil asetat özütlerinin antibiyofilm etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. *C. kilaea* metanol özütünün 75 µg/ml ve 37.5 µg/ml konsantrasyonlarının biyofilm inhibisyon yüzdeleri sırası ile 59.96 ± 0.15 ve 54.94 ± 0.13 olarak bulunurken, etil asetat özütünün ise 37.5 µg/ml konsantrasyonunda 67.85 ± 0.08 , 18.75 µg/ml 69.35 ± 0.07 ve 9.375 µg/ml konsantrasyonda ise 71.7 ± 0.11 biyofilm inhibisyonuna sahip olduğu bulunmuştur. *C. hermannii* metanol özütünde 800 ve 400 µg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla 59.14 ± 0.1 ve 38.74 ± 0.16 inhibisyon gözlemlenirken, etil asetat özütünde ise 300 µg/ml konsantrasyonda 66.22 ± 0.08 , 150 µg/ml konsantrasyonda 54.40 ± 0.14 ve 75 µg/ml konsantrasyonda ise 43.58 ± 0.1 inhibisyon gözlemlenmiştir. Elde edilen verilere göre antibakteriyel etkinliğe benzer olarak *C. hermannii* etil asetat özütü, metanol özütüne göre daha düşük konsantrasyonlarda yüksek antibiyofilm özellik göstermektedir. Sonuç olarak literatürden farklı olarak tez kapsamında kullanılan ve ciddi sorunlara yol açan gıda patojeni *B. cereus* bakterisi üzerinde her iki bitki türü içinde yüksek oranda antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliğine sahip olduğu *in vitro* çalışmalar ile tespit edilmiştir. Türkiye'ye endemik olan bu bitkilerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliklerin düşük konsantrasyonlarda bile etkili olması ileride yapılacak olan çalışmalar için bu bitki metabolitlerinin belirlenmesi için öncü olabileceği düşünülmekte ve potansiyel bir doğal bir kaynak olabileceği ön görülmektedir.

Nazaruk ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Cirsium* cinsinde ait beş farklı bitkinin su özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan kapasitelerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre *Cirsium* türlerinin, uygulanan 50 mg/ml⁻¹ yüksek konsantrasyonunda *Bacillus subtilis*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde antibakteriyel ve bakterisidal etkinlik gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Nazaruk ve ark., 2008). Shin ve arkadaşları yaptıkları ise, *Cirsium setidens* metanol özütünün *B. cereus* üzerinde antibakteriyel ve bakterisidal etkinliği olduğunu bildirmişlerdir (Shin ve ark., 2022). Bu çalışmada kullanılan *L. byzantina* bitkisinin metanol özütünün

uygulanan 75 µg/ml-37,5 µg/ml konsantrasyonlarının %18 oranında düşük antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu, etil asetat özütünün ise kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir inhibisyonunun olmadığı saptanmıştır. Daha önce yürütülen çalışmalara bakıldığında ortaya çıkan bu farklılığın nedeninin, uygulanan konsantrasyonlar ve bakteriyel suşlardaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

2021 yılında yapılan bir çalışmada, *Campanula lyrata subsp. lyrata*'nın metanol özütünün total fenol ve flavonoid miktarları, su özütüne göre daha yüksek oranda olduğunu bildirmiştir (Ayaz, 2021). Benli ve arkadaşları ise, *Campanula lyrata subsp. lyrata* metanol özütünün, *B. subtilis* üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyonun 29 mg/ml olduğunu bildirmişlerdir (Benli ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar sonucu metanol ve etil asetat özütleri denenilen *Campanula lyrata subsp. lyrata* bitkisinin, metanol özütünün negatif kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir inhibisyonunun olmadığı gözlemlenmiştir. Etil asetat özütünün ise yalnızca uygulanan 640 µg/ml konsantrasyonunda % 27.96 ± 0.05 oranında düşük seviyede inhibisyon gözlemlenmiştir. Literatür çalışmalarından farklı olarak bu tez çalışmasında kullanılan bitki örneğinin toplandığı çevresel faktörler, kullanılan farklı polaritedeki çözücüler ve uygulanan özüt konsantrasyonlarının daha düşük olması nedeniyle antibakteriyel etkinliğe sahip olmadığı düşünülmektedir.

Yapılan literatür taraması sonucunda *Campanula* ve *Cirsium* cinslerine ait yürütülen biyofilm çalışmasına rastlanılamamıştır. Ancak *Cirsium* cinsine ait türlerin, fenolik asitler ve flavonoid gibi kimyasal içerikleri içerdiği bildirilmiştir (Jordon-Thaden ve Louda, 2003). Fenolik asitlerin *Cirsium* türlerinde yaygın olarak bulunduğu ve bu fenolik asitlerin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Luo ve ark., 2021). *Cirsium* cinsinde yapılan çalışmalar sonucunda, içerisindeki antibakteriyel özelliğe de sahip olan klorojenik asit miktarı dikkat çekmiş ek olarak *Cirsium vulgare*'nin metanol ekstraktlarında gallik asit, gentisik asit, vanilik asit ve kafeik asit varlığını tespit etmişlerdir (Popescu ve ark., 2016). Tez kapsamında yapılan deneyler sonucunda, *L. byzantina* bitkisine ait metanol özütünün 600 µg/ml, 300 µg/ml ve 150 µg/ml konsantrasyonlarına ait biyofilm inhibisyon yüzdeleri sırası ile % 82.44 ± 0.15 , % 71.03 ± 0.1 ve % 39.62 ± 0.15 olarak bulunmuştur. Etil asetat özütünün ise 800 µg/ml % 56.68 ± 0.17 ve 400 µg/ml konsantrasyonun % 32.77 ± 0.13 biyofilm inhibisyonuna

sahip olduğu tespit edilmiştir.

Taskin ve Bitis, 2016 yılında yürüttükleri çalışmada *Campanula lyrata* bitkisinin total fenolik madde miktarını tespit etmiştir ve çalışmada kullanılan bitkilerden en iyi sonuç veren tür olduğunu bildirmişlerdir (Taskin ve Bitis, 2016). Korkmaz ve arkadaşları *Campanula* cinsine ait ve endemik bir bitki olan *Campanula latifolia subsp. latifolia* bitkisinin kimyasal içeriğini HPLC kullanarak belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre *C. latifolia subsp. latifolia* bitkisinin ana kimyasal bileşenlerinin sinapik, benzoik, siringik ve p -kumarik asitlerin olduğu raporlanmıştır. *C. latifolia subsp. latifolia*'nın yüksek fenolik içeriğinden dolayı antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu raporlanmıştır (Korkmaz ve ark., 2020). *Campanula lyrata subsp. lyrata* bitkisinin metanol özütünde yalnızca en düşük konsantrasyon olan 60 µg/ml konsantrasyonunda 19.57 ± 0.08 biyofilm inhibisyonu olduğu belirlenmiştir. Etil asetat özütünde ise 160 µg/ml konsantrasyonda 43.78 ± 0.13 , 80 µg/ml konsantrasyonda ise 25.86 ± 0.1 oranında biyofilm inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda fenolik madde miktarı ve antibiyofilm inhibisyon aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Sartini ve ark., 2019). Tez çalışmamızda kullanılan *Campanula* ve *Cirsium* bitki türlerinin göstermiş oldukları yüksek antibiyofilm etkinliği fenolik, flavonoid ve antioksidan içeriklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu iki tür için tez amacına uygun olarak gıda patojeni olan *B. cereus* bakterisinin oluşturabileceği biyofilm yapılarını inhibe etmek için kullanılabileceği ve ileriki çalışmalar için öncü olabileceği düşünülmektedir.

Papp, 2004 yılında yaptığı araştırmada *Euphorbia amygdaloides*'in *B. subtilis* üzerinde antibakteriyel aktivitesinin olduğunu disk difüzyon yöntemini kullanarak saptamıştır. Yapılan bir başka çalışmada *Euphorbia fusiformis* metanol özütünün *B. subtilis* ve *S. aureus* gibi gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinliği olduğu belirlenmiştir (Natarajan ve ark., 2005). Mohsenipour ve Hassanshahian 2016 yürüttükleri çalışmada, *Euphorbia hebecarpa* etanol özütünün 90 µg/ml konsantrasyonunun *B. cereus* üzerindeki MİK değeri olduğunu gözlemlemişlerdir (Mohsenipour ve Hassanshahian, 2016). *E. amygdaloides subsp. robbiae* metanol özütünde 1,6 mg/ml, 800 ve 400 µg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla 96.25 ± 0.01 , 66.23 ± 0.05 ve 20.01 ± 0.01 inhibisyon gözlemlenirken, etil asetat özütünde kontrol grubuna göre anlamlı inhibisyon gözlemlenmemiştir. Tez kapsamında yapılan

deneylerde, kullanılan çözücünün farklı olması ve gıda patojenitesi olan *B. cereus* suşunun kullanılmasından dolayı literatürle farklı sonuçlar elde edildiği düşünülmektedir.

Perumal ve Mahmud 2013 yılında yürüttükleri çalışmada, *Euphorbia hirta* metanol özütünün, 500 µg/ml konsantrasyonunun *B. cereus* üzerinde antibiyofilm etkinliği olduğunu bildirmişlerdir (Perumal ve Mahmud, 2013). Araştırılan bir diğer çalışmada ise *Euphorbia chamaesyce* bitkisinin etanol özütünün, 25 mg/ml konsantrasyonunun *B.cereus* biyofilmini inhibe ettiği saptanmıştır (Rugaie ve ark., 2023). Yapılan deneyler sonucunda *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* metanol özütünün 200 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının biyofilm inhibisyon yüzdeleri sırası ile 57.62 ± 0.17 ve 38.65 ± 0.12 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda metanol özütünün antibiyofilm aktivitesi literatüre benzerlik göstererek inhibisyona sahip olduğu görülmekte ve literatür tarafından desteklenmektedir. Ayrıcı antibakteriyel etkinlik göstermeyen etil asetat özütünün uygulanan konsantrasyonlarında ise antibiyofilm etkinlik gözlemlenmiştir. Etil asetat özütünün 640 µg/ml konsantrasyonunda 63.98 ± 0.13 , 320 µg/ml’de 49.44 ± 0.11 ve 160 µg/ml’ de ise 38.08 ± 0.11 biyofilm inhibisyonuna sahip olduğu görülmüş ve sonuçlar negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Literatürden farklı olarak etil asetat özütlerinin gıda patojeni olan *B. cereus* bakterisi üzerinde yüksek oranda antibiyofilm aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş ve literatüre katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızda Türkiye’ye endemik olan *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Lophiolepis byzantina*, *Campanula lyrata subsp. lyrata* ve *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* bitkilerinin gıda patojeni *B. cereus* bakterisi üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlerindeki farklılıklar bitkilerin içerdiği metabolitlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *B. cereus* bakterisinin özellikle oluşturduğu biyofilm yapısı nedeniyle ortaya çıkan sorunlar ile başa çıkabilmek adına potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

B. cereus'un çeşitli zamanlarda birçok gıda kaynaklı salgına sebebiyet verdiği ve gıda zehirlenmelerinin en büyük sebeplerinden biri olduğu bilinmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin (ECDC) raporuna göre, Avrupa Birliğindeki gıda kaynaklı salgınların en yaygın dördüncü kaynağının *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. *B. cereus* aynı zamanda biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bir patojen olması nedeniyle, gıda endüstrisinde ekonomik kayıplara ve gıda kaynaklı sorunlar nedeniyle insan sağlığında ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında, gıda patojeni olan *B. cereus*'un ve oluşturduğu biyofilm formunun inhibisyonu hedeflenmiştir. Bitkiler, içerdikleri sekonder metabolitler, fenol, flavonoid ve antioksidan bileşiklerinden dolayı antibakteriyel ve antibiyofilm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ülkemizde geniş yayılım gösteren bitki türleri sıklıkla çalışılmış olup, biyolojik aktiviteleri bilinmektedir. Bu nedenle çalışma kapsamında Türkiye'ye endemik beş bitki türünün, gıda patojeni olan *B. cereus* üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre;

- *Centaurea kilaia* ve *Centaurea hermannii* bitkilerinin her iki özütünün (metanol ve etil asetat) de *B. cereus* üzerinde antibakteriyel etkinliği olduğu, *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* bitkisinin ise yalnızca metanol özütünün *B. cereus* üzerinde antibakteriyel etkinliği olduğu belirlenmiştir. Diğer bitkilerde antibakteriyel etkinlik gözlemlenmemiştir.
- *Campanula lyrata subsp. lyrata* bitkisinin metanol özütü hariç diğer bütün bitki özütlerinin, *B. cereus* biyofilm formunda %40'ın üzerinde inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalar sonucu bitkilerin sağlık açısından kullanılması güvenilir olarak kabul edilmekte ve günümüzde de halen sıklıkla ilaç etken maddesi veya halk arasında sıklıkla çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Bitkiler sahip oldukları sekonder metabolitler ve biyolojik aktiviteleri sayesinde çeşitli hastalıkların tedavisinde önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Bu bileşiklerden birçoğunun özellikle antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelere sahip olması dolayısıyla *in vitro* ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan bitkiler, yalnızca Türkiye'de yetişen endemik türlerdir. Bu çalışma, endemik bitkilerin aktivitelerine ve içerdikleri bileşenlerin tespitine yönelik çalışmaların artırılması ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi

için yürütülen bir n çalışma niteliği taşımaktadır. İlerleyen çalışmalarda bu bitki özütlerinin antioksidan özellikleri, total fenol ve flavonoid madde miktarının tespiti ve içerdikleri kimyasal bileşiklerin ortaya konması hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR

1. Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International journal of microbiology*, 2020.
2. Adame-Gómez, R., Cruz-Facundo, I. M., García-Díaz, L. L., Ramírez-Sandoval, Y., Pérez-Valdespino, A., Ortuño-Pineda, C., ... & Ramírez-Peralta, A. (2020). Biofilm Production by Enterotoxigenic Strains of *Bacillus cereus* in Different Materials and under Different Environmental Conditions. *Microorganisms*, 8(7), 1071
3. Ayaz, F. (2021). Türkiye’de Yetişen *campanula lyrata* Lam. subsp. *lyrata*’nın enzim İnhibe edici etkilerinin ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 8(1), 100-108.
4. Bala, N., Aitken, E. A., Fechner, N., Cusack, A., & Steadman, K. J. (2011). Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical biology*, 49(5), 492-500.
5. Baytop T. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (past and present). Nobel Press, İstanbul, pp. 371, 1999
6. Benli, M., Bingol, U., Geven, F., Guney, K., & Yigit, N. (2008). An Investigation on the antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *African journal of biotechnology*, 7(1).
7. Bennour, N., Mighri, H., Eljani, H., Zammouri, T., & Akrou, A. (2020). Effect of solvent evaporation method on phenolic compounds and the antioxidant activity of *Moringa oleifera* cultivated in Southern Tunisia. *South African Journal of Botany*, 129, 181-190.
8. Bereksi, M. S., Hassaïne, H., Bekhechi, C., & Abdelouahid, D. E. (2018). Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants extracts commonly used in Algerian traditional medicine against some pathogenic bacteria. *pharmacognosy Journal*, 10(3).
9. Berhe, N., Tefera, Y., & Tintagu, T. (2017). Review on biofilm formation and its control options. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 8(4), 122-133.

10. Bi, Y., Xia, G., Shi, C., Wan, J., Liu, L., Chen, Y., ... & Liu, R. (2021). Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Research*, 1(2), 193-212.
11. Boncooğlu, R. Y., Touray, M., Aytar, M., & Çelik, A. (2024). Larvicidal and Antibiofilm Potential of Three Mountain Plants: *Centaurea ensiformis*, *Origanum hypericifolium*, *Paeonia turcica*.
12. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 382-398.
13. Bruyns PV, Mapaya RJ & Hedderson T (2006). A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and psbA-trnH sequence data. *Taxon* 55: 397-420.
14. Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., ... & Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of ethnopharmacology*, 132(1), 101-108.
15. Can, L., Erol, O., Challen, G., & Küçüker, O. (2012). On the rediscovery of *Euphorbia amygdaloides* subsp. *robbiei* and its type. *Turkish Journal of Botany*, 36(6), 650-654.
16. Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 357-377.
17. Chemsá, A. E., Zellagui, A., Öztürk, M., Erol, E., Ceylan, O., & Duru, M. E. (2018). The chemical composition of *Centaurea furfuracea* Coss. and Dur. essential oil with antioxidant, anticholinesterase and antibiofilm activities. *Journal of ongoing chemical research*, 3(2), 54-63.
18. Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
19. Ciloglu, F. U., Caliskan, A., Saridag, A. M., Kilic, I. H., Tokmakci, M., Kahraman, M., Aydın, O., 2021. "Drug-resistant *Staphylococcus aureus* bacteria

- detection by combining surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and deep learning techniques”, Scientific reports, 11(1), 18444.
20. Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Høiby, N. (2022). Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 621-635.
 21. Damboldt J, Campanula L. In: Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vol. 6, Ed: P.H. Davis, pp. 2-64, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1988.
 22. Danish, P., Ali, Q., Hafeez, M. M., & Malik, A. (2020). Antifungal and antibacterial activity of aloe vera plant extract. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020(1).
 23. Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.
 24. Del Guacchio, E., Bureš, P., Iamónico, D., Carucci, F., De Luca, D., Zedek, F., & Caputo, P. (2022). Towards a monophyletic classification of Cardueae: restoration of the genus *Lophiolepis* (= *Cirsium* pp) and new circumscription of *Epitrachys*. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(5), 1269-1290.
 25. Dongari-Bagtzoglou, A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert review of anti-infective therapy*, 6(2), 201-208.
 26. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
 27. Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16.
 28. Duport, C., Jobin, M., & Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: from stress to disease. *Frontiers in Microbiology*, 7, 222516.
 29. Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10-1128.
 30. El Guerraf, A., Ben Jadi, S., Bakirhan, N. K., Kiymaci, M. E., Bazzouai, M., Ozkan, S. A., & Bazzouai, E. A. (2022). Antibacterial activity and volatile organic compounds sensing property of polypyrrole-coated cellulosic paper for food packaging purpose. *Polymer Bulletin*, 79(12), 11543-11566.

31. Eskin, B., Ozyigit, I. I., Dogan, I., Altay, V., Demir, G., & Serin, M. (2013). Germination physiology and autecology of *Centaurea kilaea* Boiss. from Turkey. *Sains Malaysiana*, 42(10), 1473-1482.
32. European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC. (2015). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobialresistanceandconsumption/antimicrobial_resistance/pages/index.aspx.
33. Fei, P., Xie, Q., Jiang, Y., Feng, H., Chang, Y., Kang, H., ... & Chen, J. (2021). Genotyping, antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from powdered food products in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(1), 8-15.
34. Fei, P., Yuan, X., Zhao, S., Yang, T., Xiang, J., Chen, X., ... & Ji, M. (2019). Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from raw milk and cattle farm environments. *Current Microbiology*, 76(11), 1355-1360.
35. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
36. Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
37. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.
38. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*, 9, 315815.
39. Gandra, S., Barter, D. M., Laxminarayan, R., 2014. “Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know?”, *Clinical microbiology and infection*, 20(10), 973-980.
40. Gurler, N., Oksuz, L., Muftuoglu, M., Sargin, F. D., & Besisik, S. K. (2012). *Bacillus cereus* catheter related bloodstream infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1).

41. Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 50(1), 101-104.
42. Hollmann, B., Perkins, M., & Walsh, D. (2022). Biofilms and their role in pathogenesis. British Society for Immunology. Available online: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/biofilms-and-their-role-in> (accessed on 7 August 2020).
43. <https://kocaelibitkileri.com> Erişim Tarihi: 25/05/24
44. <https://powo.science.kew.org/> Erişim Tarih: 20/05/24
45. <https://www.tarimorman.gov.tr/> Erişim Tarihi: 25/05/2024
46. Huang, Y., Flint, S. H., & Palmer, J. S. (2020). *Bacillus cereus* spores and toxins—The potential role of biofilms. *Food microbiology*, 90, 103493.
47. Huang, Y., Flint, S. H., Loo, T. S., & Palmer, J. S. (2022). Emetic toxin production of *Bacillus cereus* in a biofilm. *LWT*, 154, 112840.
48. Hussain, M. S., & Oh, D. H. (2017). Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. *Food Control*, 77, 270-280.
49. Ikram, S., Heikal, A., Finke, S., Hofgaard, A., Rehman, Y., Sabri, A. N., & Økstad, O. A. (2019). *Bacillus cereus* biofilm formation on central venous catheters of hospitalised cardiac patients. *Biofouling*, 35(2), 204-216.
50. Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiology letters*, 236(2), 163-173.
51. Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märtlbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins*, 12(11), 701.
52. Jordon-Thaden, I. E., & Louda, S. M. (2003). Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds?. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(12), 1353-1396.
53. Karunakaran, E., & Biggs, C. A. (2011). Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 1161-1175.

54. Kısa, D., Imamoglu, R., Genc, N., Taslimi, P., Kaya, Z., & Taskin-Tok, T. (2023). HPLC analysis, Phytochemical Content, and Biological Effects of *Centaurea kilae* Against Some Metabolic Enzymes: In Vitro and In Silico Studies. *ChemistrySelect*, 8(6), e202204196.
55. Korkmaz, B., Fandakli, S., Barut, B., Yildirim, S., Sener, S. O., Ozturk, E., ... & Yayli, N. (2020). Volatile and phenolic components and antioxidant, acetylcholinesterase, tyrosinase, α -glucosidase inhibitory effects of extracts obtained from *Campanula latifolia* L. subsp. *latifolia*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5), 1118-1131.
56. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010306.
57. Kozłowska, M., Ścibisz, I., Przybył, J. L., Laudy, A. E., Majewska, E., Tarnowska, K., ... & Ziarno, M. (2022). Antioxidant and antibacterial activity of extracts from selected plant material. *Applied Sciences*, 12(19), 9871.
58. Kuroki, R., Kawakami, K., Qin, L., Kaji, C., Watanabe, K., Kimura, Y., ... & Watanabe, H. (2009). Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Internal medicine*, 48(10), 791-796.
59. Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 510-543.
60. Lin, Y., Briandet, R., & Kovács, Á. T. (2022). *Bacillus cereus* sensu lato biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm*, 4, 100070.
61. Luo, W., Wu, B., Tang, L., Li, G., Chen, H., & Yin, X. (2021). Recent research progress of *Cirsium* medicinal plants in China. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114475.
62. MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622-628.
63. Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016). The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140-146.

64. Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
65. Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R., & Wiart, C. J. B. C. M. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC complementary medicine and therapies*, 20, 1-11.
66. Mohsenipour, Z., & Hassanshahian, M. (2016). Antibacterial activity of *Euphorbia hebecarpa* alcoholic extracts against six human pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(6).
67. Natarajan, D., Britto, S. J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., & Perumal, G. (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*—A rare medicinal herb. *Journal of ethnopharmacology*, 102(1), 123-126.
68. Nazaruk, J., Czechowska, S. K., Markiewicz, R., & Borawska, M. H. (2008). Polyphenolic compounds and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. *Natural Product Research*, 22(18), 1583-1588.
69. Ostorhazi, E., Voros, E., Nemes-Nikodem, E., Pinter, D., Sillo, P., Mayer, B., ... & Otvos Jr, L. (2013). Rapid systemic and local treatments with the antibacterial peptide dimer A3-APO and its monomeric metabolite eliminate bacteria and reduce inflammation in intradermal lesions infected with *Propionibacterium acnes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents*, 42(6), 537-543.
70. O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
71. Ozcan, M., Ayaz, F.A., Ozogul, Y., Glew, R., Ozogul, F. (2016) Fatty acid composition of achenes of *Cirsium* taxa (Asteraceae, Carduoideae) from Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 71(3-4), 45-54.
72. Ozyigit, I. I., Eskin, B., Uras, M. E., Sen, U., Erdogan, B. E., Kurmanbekova, G., ... & Yalcin, I. E. (2018). Some heavy metals and mineral nutrients of narrow endemic *Cirsium byzantinum* Steud. from Istanbul, Turkey: Plant-Soil interactions. *Fresenius Environ Bull*, 27(2), 668-674.

73. Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
74. Papp, N. (2004). Antimicrobial activity of extracts of five Hungarian Euphorbia species and some plant metabolites. *Acta Botanica Hungarica*, 46(3-4), 363-371.
75. Park SH, Sim YB, Lim SS, Kim JK, Lee JK, Suh HW. Antinociception effect and mechanism of *Campanula punctata* extract in mouse. *Korean J Physiol Pharmacol* 14(5), 285-289, 2010.
76. Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.
77. Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., & Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*, 64(4), 323-334.
78. Pereira, A. P. M., & Sant'Ana, A. S. (2018). Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. *Trends in food science & technology*, 76, 101-118.
79. Perumal, S., & Mahmud, R. (2013). Chemical analysis, inhibition of biofilm formation and biofilm eradication potential of *Euphorbia hirta* L. against clinical isolates and standard strains. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 1-8.
80. Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., & Van Dijck, P. (2020). Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Front Microbiol* 11: 952.
81. Popescu, M. L., Costea, T., Nencu, I., DUȚU, L. E., & Gird, C. E. (2016). Polyphenols contents and antioxidant activity of some Romanian wild edible mushrooms. *power*, 5, 27.
82. Powell, K.I., Krakos, K.N., Knight, T.M. (2011) Comparing the reproductive success and pollination biology of an invasive plant to its rare and common native congeners: a case study in the genus *Cirsium* (Asteraceae). *Biological Invasions*. 13(4), 905-917

83. Radcliffe-Smith A (1982). Euphorbia L. In: Davis PH (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 7, pp. 571-630, Edinburgh: Edinburgh University Press.
84. Rahnema, H., Azari, R., Yousefi, M. H., Berizi, E., Mazloomi, S. M., Hosseinzadeh, S., ... & Conti, G. O. (2023). A systematic review and meta-analysis of the prevalence of *Bacillus cereus* in foods. *Food Control*, 143, 109250.
85. Ramarao, N., Tran, S. L., Marin, M., & Vidic, J. (2020). Advanced methods for detection of *Bacillus cereus* and its pathogenic factors. *Sensors*, 20(9), 2667.
86. REFERANSLAR
87. Ribeiro, S. M., Felício, M. R., Boas, E. V., Gonçalves, S., Costa, F. F., Samy, R. P., ... & Franco, O. L. (2016). New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & therapeutics*, 160, 133-144.
88. Roi J. Traite des Plantes Medicinales Chinoises, Encyclopedie Biologique, Paris 1955.
89. Rugaie, O. A., Mohammed, H. A., Alsamani, S., Messaoudi, S., Aroua, L. M., Khan, R. A., ... & Qureshi, K. A. (2023). Antimicrobial, Antibiofilm, and Antioxidant Potentials of Four Halophytic Plants, *Euphorbia chamaesyce*, *Bassia arabica*, *Fagonia mollis*, and *Haloxylon salicornicum*, Growing in Qassim Region of Saudi Arabia: Phytochemical Profile and In Vitro and In Silico Bioactivity Investigations. *Antibiotics*, 12(3), 501.
90. Salan, Ü., & ÖKSÜZ, G. T. S. (2001). Flavonoids of *Centaurea kilaea* and *C. salonitana*. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 34, 55-61.
91. Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., & Devlieghere, F. (2011). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International journal of food microbiology*, 150(1), 34-41.
92. Sánchez, E., Morales, C. R., Castillo, S., Leos-Rivas, C., García-Becerra, L., & Martínez, D. M. O. (2016). Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2016.

93. Sartini, S., Djide, M. N., & Nainu, F. (2019, October). Correlation phenolic concentration to antioxidant and antibacterial activities of several ethanolic extracts from Indonesia. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1341, No. 7, p. 072009). IOP Publishing.
94. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 8(1), 1–10.
95. Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature reviews. Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
96. Sekerler, T., Sen, A., Bitis, L., & Sener, A. (2018, December). Anticancer, antioxidant and anti-inflammatory activities of chloroform extracts from some *Centaurea* species. In *Proceedings* (Vol. 2, No. 25, p. 1542). MDPI.
97. Shin, S., Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A., Hu, X., Sathiyaseelan, A., & Wang, M. H. (2022). Functionalization of selenium nanoparticles using the methanolic extract of *Cirsium setidens* and its antibacterial, antioxidant, and cytotoxicity activities. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 12(1), 23-32.
98. Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current opinion in microbiology*, 18, 96-104.
99. Suntar, İ., AKKOL, E. K., GONENC, T. M., ERDOGAN, T. F., KELES, H., & Kivçak, B. (2015). Scientific assessment of the anti-inflammatory and wound healing potential of *Campanula lyrata* subsp. *lyrata*, a Turkish folk remedy. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 157-168.
100. Sür-Altiner, D., Gürkan, E., Sarioğlu, İ., Tuzlaci, E., & Ang, Ö. (1997). The antibacterial and antifungal effects of *Centaurea hermannii*.
101. Şen, A., Bitiş, L., Birteksöz-Tan, S., & Bulut, G. (2013). In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of some *Centaurea* L. species. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(1), 42-45.
102. Taskin, T., & Bitis, L. (2016). In vitro antioxidant activity of eight wild edible plants in Bursa province of Turkey. *medicine*, 6, 25.

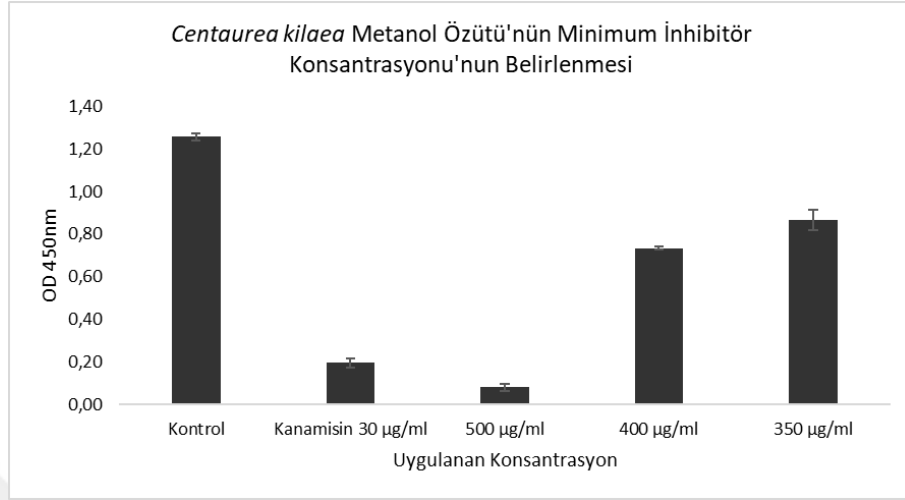
103. Tatli Cankaya, I. I., & Somuncuoglu, E. I. (2021). Potential and prophylactic use of plants containing saponin-type compounds as antibiofilm agents against respiratory tract infections. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-14.
104. Tran, S. L., Guillemet, E., Gohar, M., Lereclus, D., & Ramarao, N. (2010). CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *Journal of bacteriology*, 192(10), 2638–2642.
105. Tuipulotu, D. E., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2021). *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host–pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, 29(5), 458-471.
106. Unosson, E. (2015). *Antibacterial strategies for titanium biomaterials* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis).
107. Velez, R., & Sloand, E. (2016). Combating antibiotic resistance, mitigating future threats and ongoing initiatives. *J. Clin. Nurs*, 25(13-14), 1886-1889.
108. Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J., & Brözel, V. S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2861-2868.
109. Vishwakarma, V. (2020). Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of basic microbiology*, 60(3), 198-206.
110. Wagner, M., Ivleva, N. P., Haisch, C., Niessner, R., & Horn, H. (2009). Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS–matrix. *Water research*, 43(1), 63-76.
111. Yang, S., Wang, Y., Ren, F., Li, Z., & Dong, Q. (2023). Applying enzyme treatments in *Bacillus cereus* biofilm removal. *Lwt*, 114667.
112. Yıldırım, K. (2020). *Cirsium Macrobotrys*' in bazı biyokimyasal parametrelerinin belirlenmesi (Master's thesis, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
113. Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3423.

- 114.** Yucel, G. (2022). Seed propagation, adaptation to cultivation conditions, determination of ornamental plant properties, and ex situ conservation of the endemic species *Centaurea hermannii* F. Hermann. *BioResources*, 17(1), 616.

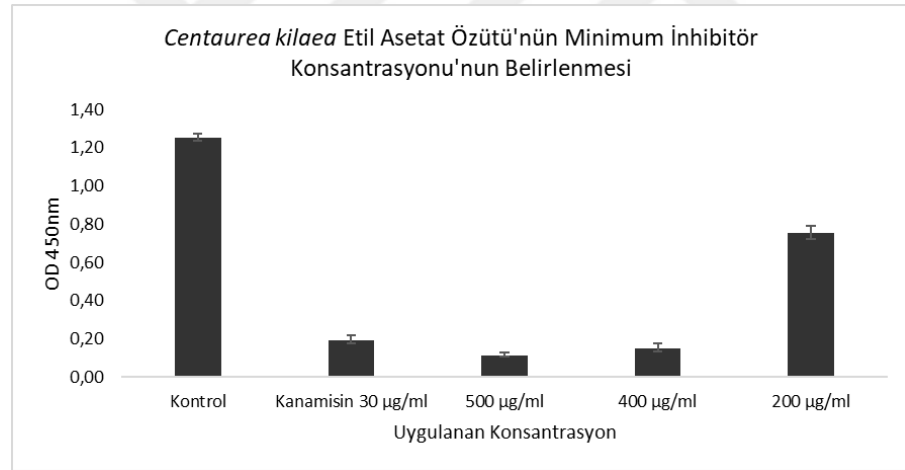


EKLER

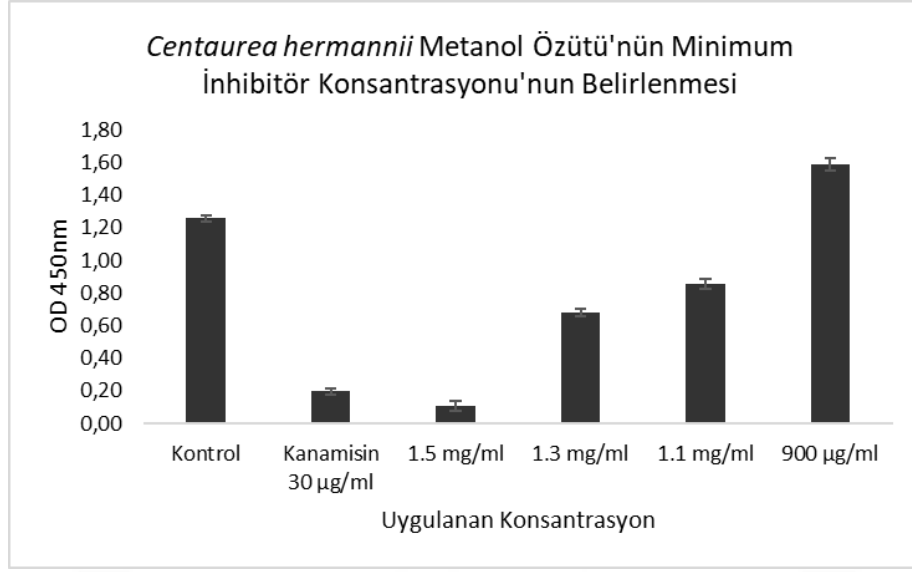
EK 1. Bitki Özütlerinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının Grafikleri



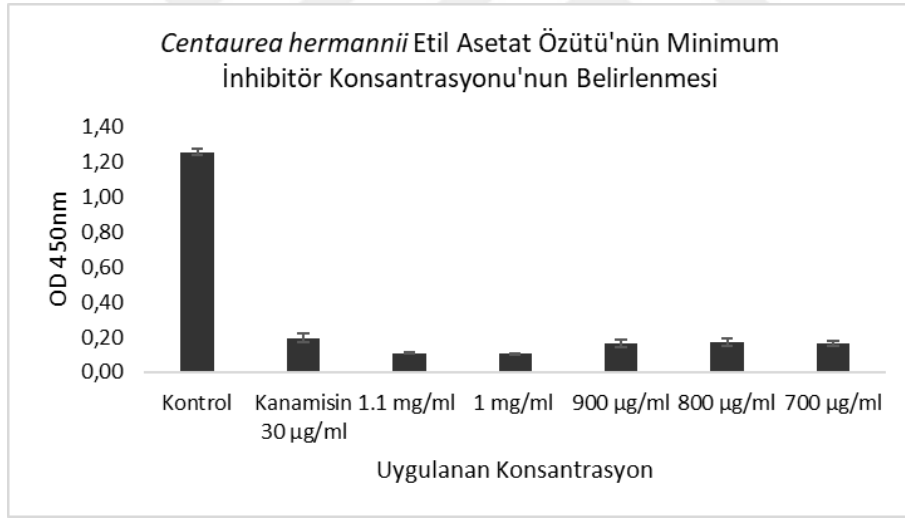
Şekil Ek 1.1. *Centaurea kila* metanol özütünün minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi grafiği.



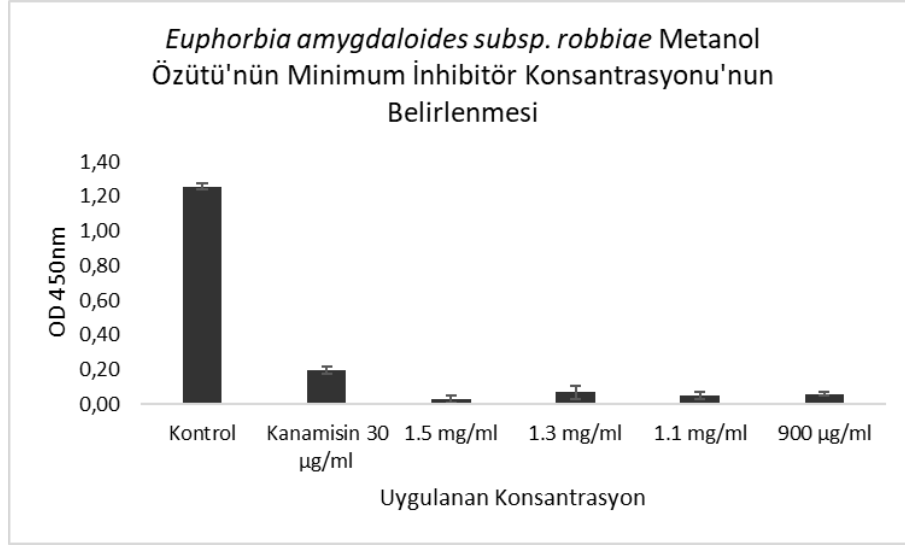
Şekil Ek 1.2. *Centaurea kila* etil asetat özütünün minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi grafiği.



Şekil Ek 1.3. *Centaurea hermannii* metanol özütünün minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi grafiği.



Şekil Ek 1.4. *Centaurea hermannii* etil asetat özütünün minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi grafiği.



Şekil Ek 1.5. *Euphorbia amygdaloides subsp. robbiae* metanol özütünün minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi grafiği.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Dena Toker

ÖĞRENİM DURUMU: Yüksek Lisans

Derece	Alana	Üniversite	Başlangıç Yılı
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2021

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Dena TOKER, Ahmet YILMAZ, Salim SUNER, Nüzhet Cenk SESAL, *CENTAUREA KILAEA* AND *CAMPANULA LYRATA SUBSP. LYRATA* LEAF EXTRACTS ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES ON *BACILLUS CEREUS*, 12th International Istanbul Scientific Research Congress

Proje Deneyimi

- FYL-2022-10792 no’lu Bapko Projesi
- Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Burs Almaya Hak Kazandı, 2022/2