



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**MASTITİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINA KARŞI BAZI
BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Reza EBRAHİMİ HARİRY

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ**

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINA KARŞI BAZI**
BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Reza EBRAHİMİ HARİRY

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Prof. Dr. Gülçin AKCA

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarına Karşı Bazı Bitkisel Ekstraktların Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Reza EBRAHİMİ HARİRY

Tarih:

İmza

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ve Toksikoloji Anabilim Dalında Reza EBRAHİMİ HARİRY tarafından hazırlanan “Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarına Karşı Bazı Bitkisel Ekstraktların Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.07.2022

Prof. Dr. Ayhan BAŞTAN
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dogüm ve Jinekoloji Anabilim Dalı
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Danışman)

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Üye)

Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Eldivan Sağlık Hizmet. MYO
Veteriner Bölümü
(Üye)

Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Raportör)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	13
1.3. Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>)	17
1.4. Amaçlar ve hedefler	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Örneklem	22
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un izolasyonu ve tanımlanması	23
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi	24
2.4. Bitkilerin toplanması, analize hazırlanması ve ekstraksiyonları	26
2.5. Ekstraktların kompozisyon analizleri	26
2.6. Disk Difüzyon Yöntemi	27
2.7. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi	29
2.8. İstatistiksel analizler	31
3. BULGULAR	32
3.1. Çiğ sütlerde <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının üretilmesi	32
3.2. Antimikrobiyal duyarlılık testi (AST)	33
3.3. Ekstraktların kimyasal bileşimi	35
3.4. Antibakteriyel etkinlik	37
3.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK)	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
ÖZET	47
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	62

ÖNSÖZ

Antimikrobiyal direnç, bakteri ve mantar gibi mikoorganizmaların onları elimine etmek için geliştirilmiş ilaçların etkisiz kaldıkları durumlarda ortaya çıkar. Bu da patojenlerin elimine olmadığı ve gelişmelerini sürdükleri anlamına gelir.

Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 2,8 milyondan fazla antimikrobiyal dirençli enfeksiyon meydana gelmektedir. Hastalık Kontrol Merkezinin (CDC) 2019 yılındaki “Antibiyotik Direnci” raporuna göre yılda yaklaşık 35.000'den fazla insanın sırf bu nedenle öldüğü kaydediliyor.

Antimikrobiyal direnç tıp, veteriner ve tarım endüstrilerinin yanı sıra yaşamın herhangi bir aşamasında insanları etkileme potansiyeline sahiptir. Bu da onu dünyanın en acil halk sağlığı sorunlarından biri haline getiriyor. Bu nedenle seçilen konu hastane enfeksiyonu olarak da bilinen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı alternatif maddelerin araştırılması olarak belirlenmiştir.

Doktora çalışmalarım boyunca her yönüyle yardım, katkı ve desteklerini gördüğüm Danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayhan Filazi ve Prof. Dr. Gülçin Akça'ya, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalındaki tüm Öğretim elemanlarına canı gönülden teşekkür ederim.

Yaptığım çalışmalarda bana katlanan ve her zaman yüreklendiren aileme de özel olarak teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
CMT	California Mastitis Testi
dk	Dakika
DMSO	Dimetildülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
ESBL	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
h/h	Hacim/hacim
Ca ²⁺	Kalsiyum
kg	Kilogram
PBP2a	Penisilin bağlayıcı proteini
L	Litre
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MHA	Mueller Hinton agar
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MS agar	Mannitol tuzlu agar
MSSA	Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
ml	Mililitre
RNA	Ribonükleik asid
°C	Santigrat
VRE	Vankomisin dirençli <i>Enterococcus</i>
VRSA	Vankomisin dirençli <i>S. aureus</i>

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> 'un Taramalı elektron mikroskopik görünümü	2
Şekil 1.2.	İnsan ve hayvanlarda stafilokoklardaki direnç genleri	5
Şekil 1.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> 'ta yeni antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonu	6
Şekil 1.4.	Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) bitkisi	13
Şekil 1.5.	Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) esansiyel yağının kimyasal bileşikleri	15
Şekil 1.6.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) bitkisi	18
Şekil 1.7.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) esansiyel yağının kimyasal bileşikleri	18
Şekil 2.1.	Araştırmaya Genel Bakış	23
Şekil 2.2.	Süt örneklerinde <i>S. aureus</i> izolasyonu ve tanımlama prosedürü	24
Şekil 2.3.	<i>S. aureus</i> suşlarında antibiyogram prosedürü	25
Şekil 2.4.	Seçilen antibiyotikler ve bitki özleri için disk difüzyon yöntemi	28
Şekil 2.5.	Ekstraktların MSSA ve MRSA suşları üzerindeki inhibitör etkileri süreci	29
Şekil 2.6.	Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)	30
Şekil 2.7.	Mikrodilüsyon yöntemiyle minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK)	31
Şekil 3.1.	(a) süt numunesi hazırlama, (b) ilk bakteri kültürü, (c) <i>S. aureus</i> 'un mikroskopik görünümü, (d) <i>S. aureus</i> ve <i>aureus</i> olmayan kültürel büyüme, (e) <i>S. aureus</i> numunelerinin katalaz testi	32
Şekil 3.2.	MSSA antibiyogramları	34
Şekil 3.3.	MRSA antibiyogramları	34
Şekil 3.4.	<i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarında <i>Rosmarinus officinalis</i> duyarlılığı; a) MSSA ve b) MRSA	38

Şekil 3.5.	<i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarında <i>Thymus vulgaris</i> duyarlılığı; a) MSSA ve b) MRSA	38
Şekil 3.6.	a) <i>Rosmarinus officinalis</i> , b) <i>Thymus vulgaris</i> , c) Penisilin ve d) Oksitetrasiklin için MSSA büyümesinin inhibisyonunu gösteren Mueller-Hinton agar (MHA) plakaları	39
Şekil 3.7.	a) <i>Rosmarinus officinalis</i> , b) <i>Thymus vulgaris</i> , c) Penisilin ve d) Oksitetrasiklin için MRSA büyümesinin inhibisyonunu gösteren Mueller-Hinton agar (MHA) plakaları	39



ÇİZELGELER

Çizelge 3.1.	Disk difüzyon yöntemi ile test edilen çiğ süt örneklerinden izole edilen metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> 'un (MSSA) antimikrobiyal duyarlılık paternleri	33
Çizelge 3.2.	Disk difüzyon yöntemi ile test edilen çiğ süt örneklerinden izole edilen metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'un (MRSA) antimikrobiyal duyarlılık paternleri	35
Çizelge 3.3.	Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>) ve Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) uçucu yağlarının kimyasal bileşimi	36
Çizelge 3.4.	MSSA ve MRSA izolatlarında <i>Rosmarinus officinalis</i> ve <i>Thymus vulgaris</i> 'in ortalama inhibisyon bölgesi (mm)	37
Çizelge 3.5.	MSSA ve MRSA izolatlarında antibiyotiklerin ortalama inhibisyon zonu (mm)	37
Çizelge 3.6.	<i>Rosmarinus officinalis</i> ve <i>Thymus vulgaris</i> ile Penisilin ve Oksitetrasiklin'in MSSA ve MRSA izolatlarına karşı direnci, MİK ve MBK'sı	39

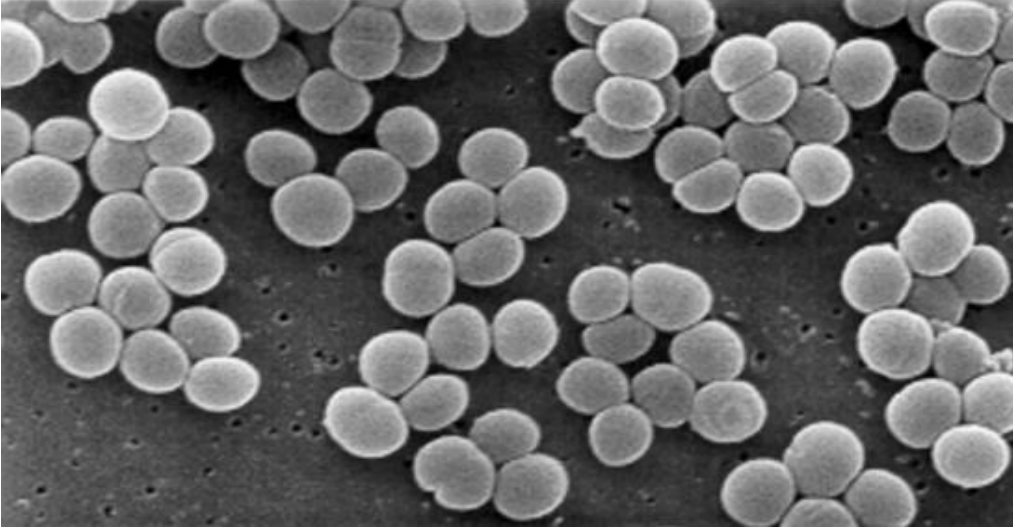
1. GİRİŞ

1.1. Genel bilgiler

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), insan ve hayvan sağlığını küresel olarak tehdit eden en önemli bakterilerden biridir (Şekil 1.1). Hafif bir enfeksiyondan yaşamı tehdit eden durumlara kadar farklı enfeksiyon türlerine ve doku ve organları etkileyebilen toksine bağlı sendromlara neden olur. Buna karşılık, risk yönetimi, tehlike analizi, kritik kontrol noktaları ve iyi hijyen uygulamaları gibi farklı yaklaşımların kullanılması kontaminasyonu önlemenin temel faktörleridir (Grace ve Fetsch, 2018). Stafilokok enfeksiyonlarına, sağlıklı bireylerin cildinde veya burnunda yaygın olarak bulunan bakterilerin de neden olabileceği ileri sürülmüştür. Çoğu zaman, bu bakteriler saprofit olup sorun yaratmaz veya nispeten küçük cilt enfeksiyonlarına neden olurlar. Ancak derinin herhangi bir nedenle hasar görmesi durumunda bakteriler hasarlı alandan daha derin dokulara ilerleyip kan dolaşımına geçerek (bakteriyemi), eklemlere, kemiklere, akciğerlere veya kalbe kadar ulaştıklarında ölümcül nitelikteki stafilokok enfeksiyonlarına neden olabilirler (Becker, 2018). Günümüzde halen birçok insan, yaşamı tehdit eden stafilokok enfeksiyonlarına maruz kalabilmektedir. Bu tür enfeksiyonların tedavisinde genellikle antibiyotikler ile enfekte olmuş bölgenin drene edilme uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, bazı stafilokok enfeksiyonları yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere artık yanıt vermemektedir (Harada ve ark., 2018).

Günümüzde stafilokoklar, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli (MRSA) *S. aureus* olmak üzere farklı türlerde bulunabilmektedir. MSSA veya MRSA, ciltte yaygın olarak bulunmaktadır. Hastalık oluşturmadaıklarında genellikle insanlar orada olduklarının farkında bile olmamakta, ancak kaza, yara, ameliyat veya iğne batması sonucu enfeksiyona neden olmaktadır. Cildin hasar görmesiyle birlikte sistemik dolaşıma geçen bu bakteri daha sonra hafif bir enfeksiyondan yaşamı tehdit eden sepsise kadar değişen şiddette enfeksiyonlara neden olabilir (Morgan, 2008). Enfekte

olmuş insanlar temasta bulundukları diğer kişilere de enfeksiyonu bulaştırabilmektedir (Tong ve ark., 2015). MSSA ile MRSA'nın *in vitro* kültürde birbirine benzediği görülmektedir. Bununla beraber aralarındaki fark stafilokok enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan metisiline verdikleri tepkiyle ölçülmektedir. MSSA enfeksiyonları antibiyotiklerle tedavi edilebilir. Bununla beraber her iki tip de ciddi ve hatta yaşamı tehdit edici olabilmektedir (Morgan, 2008).



Şekil 1.1. *Staphylococcus aureus*'un Taramalı elektron mikroskopik görünümü (Matthew J. Arduino, 2022).

S. aureus, neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran ve neredeyse tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirme yeteneği ile bilinen bir bakteridir. Bakteri, hedef DNA girazını değiştiren veya dış zar proteinlerini azaltan ve böylece ilaç birikimini azaltan genetik mutasyonlarla ilaca dirençli hale gelebilir (Kime ve ark., 2019 ve Yang ve ark., 2019). Örneğin, klindamisin ve eritromisine direnç temel olarak ribozomal RNA metilazdaki bir modifikasyondan kaynaklanır (Heelan ve ark, 2004 ve Martinez ve ark., 2018).

S. aureus suşlarının %80'den fazlasının penisilinaz salgılayabildiği ve bundan dolayı penisilinazlara dirençli metisilin gibi beta-laktam antibiyotiklerin *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanıldığı ifade edilmektedir (Leonard

ve Markey, 2008). Metisilin ilk olarak 1950'lerin sonlarında beşerî hekimlikte dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya başlanmasına rağmen, 1961'in başlarında metisiline direnç bildirilmiştir (Jevons, 1961). Aynı yıl ise metisilin varlığında *S.aureus*'un tekrarlanan pasajlarında direncin gelişebileceği gösterilmiştir (Barber, 1961).

MRSA ve MSSA türlerinin geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ile kültürleri yapıldığında morfolojik olarak birbirlerinden ayrımları yapılamamaktadır. Raporlara göre MRSA ve MSSA olan türleri koyun kanlı agar besiyeri ortamında üretildiğinde koloni yapıları arasında fark görülmediği bildirilmiştir (Santana ve ark., 2015). Bu nedenle bu türlerin ayrımı ve teşhisi için antibiyogram, moleküler yöntemler vb. ilave laboratuvar testlerinin yapılması önerilmektedir.

MRSA, 1970'lerde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ciddi bir sorun olmasına rağmen diğer ülkelerde sadece hastanelerde sporadik bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Bununla beraber MRSA, 1990'lardan itibaren tüm dünyada hastane kaynaklı bir enfeksiyon olarak ciddi bir sorun haline gelmiştir (Panlilio ve ark., 1992).

MRSA suşları, penisilinaza dayanıklı beta-laktamlar dahil tüm beta laktamlara dirençli olup, direnç en yaygın olarak *mecA* geni aracılığıyla oluşmaktadır. Bu gen bakteri hücre duvarında ifade edilen penisilin bağlayıcı proteini (PBP2a) kodlamakta ve bu da beta laktam antibiyotiklere affinitenin düşük olmasına yol açmaktadır. Böylece bu grup antibiyotikler, adı geçen geni ifade eden bakterilere karşı etkisiz kalmaktadır. Ayrıca, birçok MRSA izolatının diğer birçok antibiyotik sınıfına karşı da dirençli olduğu bildirilmiştir. MSSA suşlarının, olasılıkla koagülaz negatif stafilokok suşlarından SCC*mec* elementini almasıyla metisiline dirençli hale gelebileceğine yönelik bulgular olduğu ve bunun da birçok durumda ortaya çıktığı gösterilmiştir (Enright ve ark., 2002). SCC*mec*, *mecA* geni tarafından kodlanan geniş spektrumlu beta-laktam direncinin merkezi belirleyicisini taşıyan mobil bir genetik elementtir. Metisiline dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkmasının, SCC*mec* elementinin duyarlı suşların kromozomuna

alınması ve eklenmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, 2009).

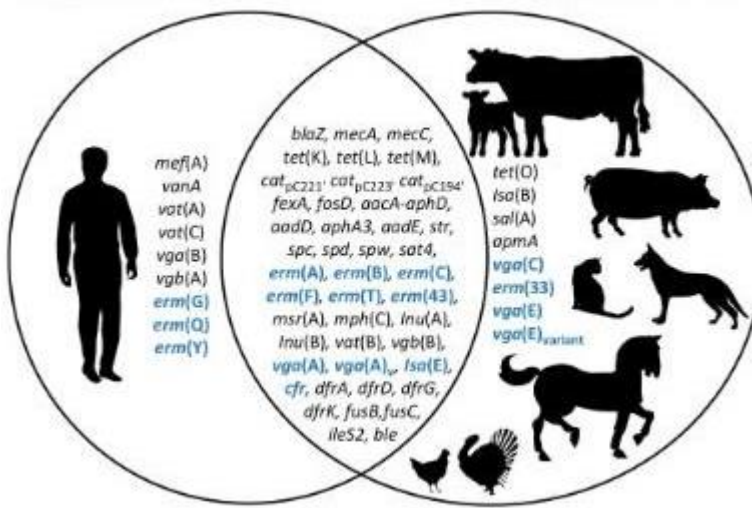
İnsanlarda stafilokokkal patogenezi karakterize eden literatür oldukça yaygın olup, *S. aureus*, halk sağlığı ve hayvancılıkta önemli bir etkiye yol açan çok sayıda hayvan bakıcısında enfeksiyon ve hastalığın ana nedeni olarak bildirilmiştir. Hayvanlardaki enfeksiyonların hayvan sağlığına zarar vermesinin yanında hayvanların insanlara stafilokok bulaşması için bir rezervuar görevi olduğu ileri sürülmüştür. Son yıllarda MRSA'nın veteriner hekimlikte de özellikle küçük baş hayvan ve tek tırnaklılarda artan bir şekilde ciddi bir sorun olmaya başladığı bildirilmiştir. (Robinson ve Enright, 2003).

Sığırlarda mastitisin nedeni olarak *S.aureus*'un önemi ve bu türlerde meme içi antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanımı göz önüne alındığında hayvanlardan MRSA'nın ilk izolatlarının mastitisli ineklerin sütlerinden elde edilmesi sürpriz olarak görülmemektedir (Devriese ve Hommez, 1975 ve Kirkan ve ark., 2005). O zamandan beri bu olmasa ayrıca diye başlasak MRSA köpek (Pak ve ark., 1999), kedi (Bender ve ark., 2005), at (Anzai ve ark., 1996), koyun (Goni ve ark., 2004), domuz (Voss ve ark., 2005) ve tavuk (Lee, 2003) gibi evcil hayvan türlerinde tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada veteriner kliniklerine gelen 65 hastadan alınan *S.aureus* izolatlarının %14'ünün MRSA ile enfekte olduğu ve MRSA enfeksiyonlarının en yaygın olarak köpek ve atlarda görüldüğü bildirilmiştir (Middleton ve ark., 2005).

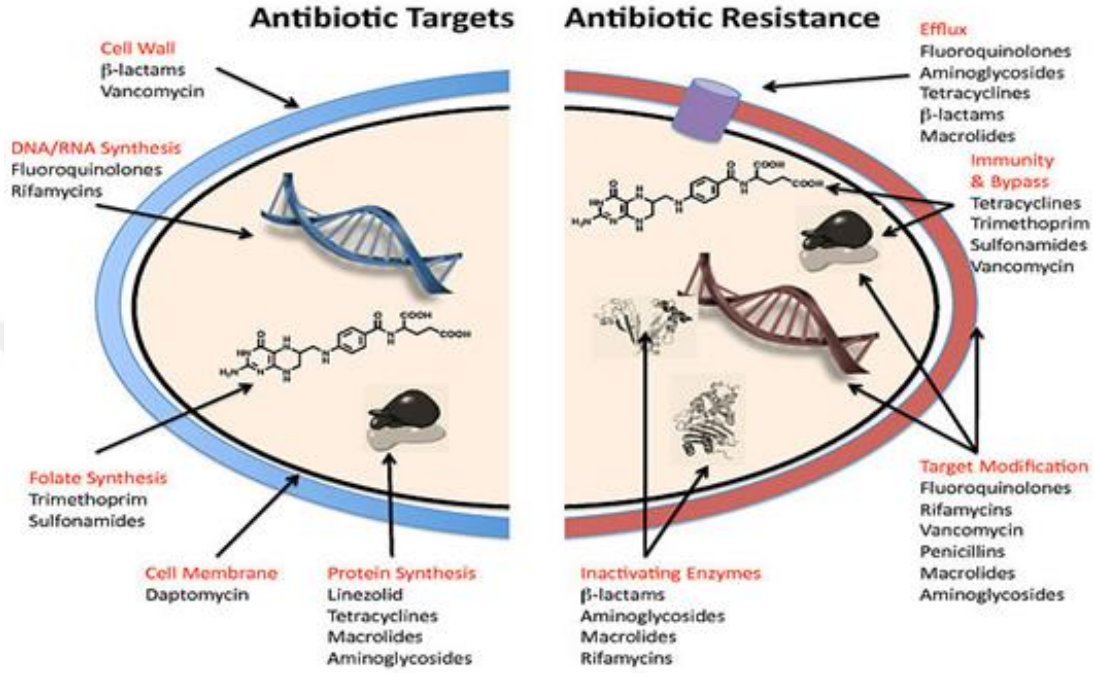
İnsanlarda MRSA'nın kontrolüne yönelik çok sayıda bilgi ve rehber yayımlanmakta (örneğin CDC MRSA rehberi, www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa.html) ve bu ilkelerin birçoğu da hayvanlardaki MRSA'nın kontrolünde kullanılabilmektedir (Coia ve ark., 2006). Bununla beraber hastalığın epidemiyolojisinde önemli farklılıklar olabileceğinden insanlardaki MRSA kontrol ilkelerinin hayvanlardakine uyarlanırken oldukça dikkat edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Weese ve ark., 2006). Günümüzde hayvanlarda kolonizasyon ve enfeksiyonun yaygınlığı ve kalıcılığı, hayvanlar ve insanlar arasındaki geçiş kolaylığı ve hayvanlarda dekolonizasyon işlemlerinin etkinliği gibi

önemli sorular hakkında veri sağlamak için kontrollü çalışmaların yetersiz olduğu kaydedilmiştir. Özellikle at haralarında yapılan çalışmalarda, haranın büyüklüğü, önceki antimikrobiyal uygulamalar, önceki kolonizasyon, aynı çiftlikteki atlarda önceden enfeksiyonun tanımlanmış olması veya kolonizasyonu ve bir veteriner hekim muayenesine sunulması gibi faktörler atlarda MRSA kolonizasyonu için en önemli risk faktörleri olup bunlarla ilgili çalışmaların sonuçları oldukça sınırlıdır (Weese ve ark., 2005). Ayrıca atlarla ilgilenen personelin ellerinde bulunan bakterileri atlara bulaştırmasıyla enfeksiyonun geçişi MRSA enfeksiyonunun önemli bir bulaşma yolu olmasına rağmen, Kanada’da yapılan bir çalışmada, veteriner kliniklerinde bulunma potansiyeli bulunan MRSA’lar nedeniyle bu alanların da yaygın bir bulaşma çevresi olabileceği rapor edilmiştir (Weese ve ark., 2004).

Pek çok patojen bakteri tek bir konakçı türüyle sınırlıyken, bazılarının konak geçişlerinden geçme kapasitesi vardır ve bu da insan ve hayvan sağlığına tehdit oluşturan yeni klonların ortaya çıkmasına neden olur. Bununla birlikte, bir multihost ekolojisini destekleyen bakteriyel özellikler iyi anlaşılmamıştır (Bacigalupe ve ark., 2019). Beşerî tıpta kritik ve son derece önemli antimikrobiyal ajanlara direnç kazandıran hayvanlardan alınan stafilokoklardaki çoklu ilaca direnç genleri ve bunların karakterizasyonları Şekil 1.2 ve 1.3’te gösterilmektedir.



Şekil 1.2. İnsan ve hayvanlarda stafilokoklardaki direnç genleri (Wendlandt ve ark., 2015).



Şekil 1.3. *Staphylococcus aureus* suşunda görülen yeni antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonu (Wright, 2010).

Özellikle MRSA'nın yaygınlaşmasıyla birlikte halk sağlığına yönelik endişeler artmakta ve böylece alternatif antibakteriyel bileşiklerin geliştirilmesi zorunluluğu olduğu görülmektedir. MRSA'nın yanı sıra invaziv nitelikteki MSSA'nın da önemli bir halk sağlığı sorunu olduğu belirtilmelidir. Dolayısıyla halk sağlığının korunması ve enfeksiyonların önlenmesi, MRSA'ya ek olarak MSSA'ya da yönelik olmalıdır. *S. aureus* ayrıca, besi hayvanlarında da görüldüğünden gıda zehirlenmesine neden olan bir patojen olarak kabul edilmiştir (Akindolire ve ark., 2015). Hastanelerden veya diğer insanlardan bulaşan *S. aureus* suşları, ağırlıklı olarak insanları etkileyen patojen potansiyele sahip suşlardır. Bununla birlikte, hayvanlarla ilişkili MSSA ve MRSA, özellikle etkilenen hayvanlarla mesleki temasın olduğu durumlarda, insanlar tarafından da alınabilmektedir (Marzoli ve ark., 2021). Son raporlara göre, antibakteriyellere dirençli stafilokok suşlarının yaygınlığı ciddi bir biçimde artış göstermiştir. Farklı antibiyotiklerin yaygın

olarak uygulanması, büyük sağlık sorunlarına yol açan antibiyotik direncinin gelişmesinin ana nedenidir (Kurlenda ve Grinholc, 2012).

MRSA normalde, beta-laktamlar, aminoglikozitler, fluorokinolonlar ve makrolidler gibi antibiyotiklere dirençli olan çoklu ilaç-dirençli (multidrug-resistant) genotipe sahiptir. Günümüzde sadece glikopeptidlere (vankomisin ve teikoplanin) duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber bunlara karşı da dirençli izolatlar bulunduğu rapor edilmektedir (Barrett, 2005; Berger ve Rohrer, 2002 ve Goldstein, 2007). Bildiğimiz kadarıyla MRSA suşlarına etki eden ilk beta-laktam antibiyotik olan 5. kuşak sefalosporin “seftarolin” 2010 yılının Ocak ayında ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onay alarak kullanıma sunulmuştur (Steed ve Rybak, 2010). Seftarolinin MRSA’nın yanı sıra vankomisine dirençli Enterococcus (VRE) ve vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) dahil birçok dirençli Gram pozitif bakteriyle birlikte *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) retmeyen *Escherichia coli*, ESBL retmeyen *Klebsiella pneumoniae* gibi Gram negatif bakterilere karşı da *in vitro* etkinliği ispatlanmış, böylece oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu belirtilmiştir (Brown ve Traczewski, 2009). Yapılan bir çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na gönderilen farklı klinik örneklerden (yara, kan, idrar) izole edilen 98 MRSA suşunun seftarolin, vankomisin ve linezolid için belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerlerinin sırasıyla 0,125-1 µg/mL, 0,75-1,5 µg/mL ve 0,38-1,5 µg/mL olduğu ve bu sonuçlara göre bütün MRSA suşlarının seftarolin, vankomisin ve linezolide duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Coşkun ve ark., 2017).

Özellikle yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastalarda, yaşlı ve mükerrer hastaneye yatırılan hastalarda MRSA’nın klinik izolatlarına sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir. Bu nedenle MRSA’ya etkili ve farklı etki mekanizmalarına sahip yeni ilaçların geliştirilmesine acil ihtiyaç olduğu ifade edilmektedir (Enright, 2003).

Günümüze kadar, ilaç endüstrisi yeni antimikrobiyaller geliştirerek ya da mevcut olanları değiştirerek bu sorunun üstesinden gelmeye çalışmaktadır. Bununla beraber son 40 yılda yalnızca yukarıda belirtilen üç yeni sınıf antibiyotik geliştirilebilmiş ve bunların hepsi de Gram pozitif bakterilerin yaptığı enfeksiyonların tedavisiyle sınırlı kalmıştır. Gram negatiflerde ise çoklu ilaç direnci gün geçtikçe artmış ve tüm dünyada büyük sorun olmaya başladığı gibi ilaç direncinin yayılmasında da oldukça önemli rol oynamışlardır. Bunlara ek olarak antibiyotik direncinin üstesinden gelmek için yeni geliştirilen stratejiler, direnci hızlı bir şekilde yayabilen bakteriler karşısında her geçen gün daha da etkisiz kalmaktadır. Bu durum geleneksel antibiyotiklerden farklı mekanizmalar ile etki gösterebilecek yeni maddelerin gereksinimini zorunlu kılmaktadır (Parisien ve ark., 2008).

Son yıllarda, kümes hayvanları, domuz eti ve sığır eti gibi çeşitli hayvan kaynaklı gıdalardan *S. aureus* suşları izole edilmiş ve bunların toplumla ilişkili *S. aureus*'un rezervuarı ve kaynağı olabileceği düşünülmüştür. Hayvanlar, özellikle spesifik konakçı tropizminden yoksun görünen klonlar için *S. aureus* zoonotik enfeksiyonlarının bir kaynağı olarak hareket edebilirken, insanlar çiftlik hayvanlarını etkileyen yeni patojenik suşların önemli bir kaynağını temsil edebilirler. Ayrıca *S. aureus*, süt sığırlarında mastitisin en önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir ve süttten izole edilmiştir. Metisilin mastitis tedavisinde kullanılmamaktadır. Ayrıca çevrenin doğal koşullarında birkaç ay hayatta kalabileceği göz önüne alındığında, hayvanlardaki MRSA enfeksiyonunun kaynaklarından birinin de çevre olabileceği ifade edilmektedir (Basanisi ve ark., 2017).

Birçok çalışmada süt ve süt ürünlerinde yüksek *S. aureus* prevalansı bildirilmiştir. *S. aureus*'un süt sığırlarında en önemli bulaşıcı mastitis patojenlerinden biri olduğu görülmektedir. Zoonotik potansiyeli nedeniyle *S. aureus*'un kontrolü sadece süt endüstrisinde büyük ekonomik öneme sahip olmayıp, aynı zamanda önemli bir halk sağlığı sorunu da olmaktadır. Ayrıca birçok ülkede süt ve süt ürünlerinde klasik

enterotoksinlerin saptanması ve *S. aureus*'un enterotoksin genlerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar yapılmıştır (Kadlec ve ark., 2019).

Süt, stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmelerinin önemli bir kaynağıdır. *S. aureus*, kontamine ve işlenmemiş süt ve süt ürünleri yoluyla insanlara bulaşabilir. Son raporlara göre, toplam *S. aureus* izolat sayısı içinde antibiyotiklere dirençli suşların oranı giderek artmaktadır (Fujikawa ve Morozumi, 2006). Bu nedenle *S. aureus* enfeksiyonlarını önlemek ve ortadan kaldırmak için antibiyotiklere alternatif olarak, bitki kaynaklı bileşikleri de içeren yolların araştırılması önemli bir fırsat olarak gösterilmektedir (Martin ve Ernst, 2003).

Bitkilerin farklı kısımlarının yemeklere aroma ve tat vermek için kullanıldığı bilinmektedir. Çeşitli şıfalı bitkiler, antioksidan, anti-inflamatuar, antidiyabetik, antihipertansif ve antimikrobiyal aktiviteler gibi terapötik özelliklere sahiptir (Esiyok ve ark., 2004 ve Martínez-Graciá ve ark., 2015). Bu nedenle, süt ürünlerinin şıfalı otlar ile takviye edilmesi, besleyici ve tıbbi değere sahip fonksiyonel süt ürünleri sağlamaya yardımcı olabilir. Ayrıca, tüketiciler için zenginleştirilmiş gıdaların görünümünü ve çekiciliğini geliştirmek ve bu bitkilerin satışını artırmak için şıfalı bitkiler kullanılmaktadır (El-Sayed ve Youssef, 2019). Bu nedenle, patojen mikroorganizmalarla mücadele etmek için süt ürünlerine yalnızca en kaliteli otlar eklenebilir. Otlar, sadece gıda aroması olarak değil, aynı zamanda sağlık özellikleri için de yaygın olarak kullanılan doğal maddelerdir. Bitkilerde bulunan antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser bileşenleri, insan ve hayvan varlığının sağlık ve tıbbi durumunu iyileştirmelerini sağlayabilir.

S. aureus enfeksiyonlarını önlemek ve ortadan kaldırmak için bitki kaynaklı bileşikler gibi mevcut antibiyotiklerin yerine alternatif yolların belirlenmesi ve araştırılması önemli bir fırsat olarak görünmektedir (Kurlenda ve Grinholc, 2012). Birçok hastalığın insan uygarlığı boyunca bitkisel ilaçlarla tedavi edildiğı bilinmektedir. Bugün bile, bitki materyalleri birincil sağlık hizmetlerinde büyük rol oynamakta ve daha gelişmiş

bitkiler yeni antimikrobiyal maddelerin potansiyel kaynağı olarak bilinmektedir. Endemik bitkiler çeşitli metabolitlerin rezervleridir ve çeşitli biyolojik özelliklere sahip önemli kimyasalların sınırsız kaynağına sahiptirler. Günümüzde modern ilaçların çoğu bitkisel kaynaklıdır (Ibezim, 2015). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), yaklaşık 20,000 bitki türünün tıbbi amaçla kullanılabileceğini rapor etmektedir (Maregesi ve ark., 2008). Yapılan araştırmalar Türkiye'nin bitki florasının hem tür hem de endemik açıdan önemli bir gen merkezi olduğunu göstermektedir. Bütün Avrupa yaklaşık 12,000 bitki türü içermesine karşın, Türkiye tek başına 9,000 civarında türe sahip olup bunların yaklaşık 3,000 kadarı endemiktir (Nalbantbaş ve Gölcü, 2009). Türkiye'de tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin sayısı kesin olarak bilinmemekle beraber bu sayının 500-1000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu da ifade edilmiştir (Berber ve ark., 2013).

Son yıllarda özellikle Çin'de bitki ekstraktlarının antimikrobiyal tedavide kullanılması bilim dünyasının bu konuya ilgisini çekmiştir. Fitoterapi adı da verilen bu uygulama artık tüm dünyada yaygınlaşmaya başlamıştır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve değişik özler binlerce yıldır değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Bunların antimikrobiyal özelliklere sahip olması, doğal ve işlenmiş gıdaların korunması, farmasötik, alternatif tıp ve doğal tedaviler dahil olmak üzere, birçok uygulamada temel olarak kullanılmalarını sağlamıştır (Hammer ve ark., 1999). Bu yüzden bitki özleri, uçucu yağlar ve sekonder metabolitler dahil alternatif antimikrobiyal kaynaklarla ilgili araştırmalara yoğun bir ilgi olduğu görülmektedir (Salamcı ve ark., 2007).

Çin'de değişik amaçlarla kullanılan 19 bitkinin MRSA'ya yönelik etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada (Zuo ve ark., 2008), araştırmaya konu 19 bitkinin MRSA'ya yönelik MİK değerleri 1,25 ile 3,07 mg/mL arasında bulunmuş olup, yapılan değerlendirmede en etkili antimikrobiyal bitkilerin *Dendrobenthamia capitata*, *Elsholtzia rugulosa*, *Elsholtzia blanda* (Köri yaprağı), *Geranium striatipes* (Sardunya) ve *Polygonum multiflorum* (Mührü Süleyman) (MİK ≤ 1,43 mg/mL) olduğu ve *Dendrobenthamia capitata*'nın etil asetat ile ekstrakte edilen kısmından izole edilen

betulinik asidin MİK/MBK değerinin 62,5/125,0 mg/mL olduğu belirtilmiştir. Sonuçta *Dendrobenthamia capitata*, *Elsholtzia rugulosa*, *Elsholtzia blanda*, *Geranium strictipes*, *Polygonum multiflorum* ve betulinik asidin MRSA'ya yönelik *in vitro* etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Merghni ve ark, (2018), tarafından yapılan bir araştırmada ise *Eucalyptus globulus* (Ökalyptus) esansiyel yağı ve onun ana bileşeni olan 1,8-cineole'nin MRSA biyofilmlerine karşı güçlü etkili olduğu gösterilmiştir. *Nigella sativa* (Çörek otu)'nın esansiyel yağ ekstraktının test edilen MRSA suşlarının %62'sine yönelik etkileri olduğu (Emeka ve ark., 2015), 4 mg'lık disk formuna getirilen etanol ekstraktlarının ise test edilen tüm MRSA izolatlarını inhibe ettiği (Hannan ve ark., 2008) bildirilmiştir. Nijerya'da yapılan başka bir araştırmada ise *Terminalia avicennioides*, *Phyllanthus discoideus*, *Ocimum gratissimum* ve *Acalypha wilkesiana*'nın hem su hem de etanol ekstraktlarının MRSA'ya etkili olduğunu ve bunun içerdikleri antraknon bileşiklerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Akinyemi ve ark., 2005). Bunların dışında *S.aureus*'a karşı sofora alkaloitlerinin (Wang ve ark., 2018), *Cuminum cyminum* (kimyon), *Punica granatum* (nar) ve *Syzygium aromaticum* (karanfil) ekstraktlarının (Mostafa ve ark., 2017), *Pithecellobium dulce* (hint hurması)'nin hekzan, etanol ve etil asetat ekstraktlarının (Bhat ve ark., 2018) etkili oldukları gösterilmiştir. Ayrıca *Garcinia zeylanica*, *Jasminum officinale* (yasemin), *Rubia cordifolia* (kökboya) ve *Pongamia pinnata* (hint kayın ağacı) (Gunasekara ve ark., 2017) ile *Punica granatum* ve *Tabebuia avellanedae* (Machado ve ark., 2003) ve *Turnera ulmifolia* ekstraktlarının (Coutinho ve ark., 2009) MRSA'ya karşı etkili olabilecekleri kaydedilmiştir.

Yapılan bir araştırmada Türkiye'de geleneksel olarak tedavi amacıyla kullanılan 19 bitkinin antimikrobiyal etkinlikleri 14 patojen suşa karşı araştırılmış ve bunlardan en iyi MİK ve MBK değeri gösteren yedi bitki ekstraktının (*Cornus sanguinea*, *Punica granatum*, *Vitis vinifera*, *Liquidambar orientalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Ecballium elaterium*, *Eucalyptus camuldulensis*) etkileri MRSA, *E.coli* ve *Candida albicans*'a yönelik araştırılmıştır. Bunların MİK ve MBK değerlerinin sırasıyla 8-14,2 mg/mL ve 14,2-24,4 mg/mL arasında değişebileceği gösterilmiştir (Oskay ve Sarı, 2007). Avşar ve ark. (2016), tarafından yapılan bir araştırmada ise Sinop'tan toplanan *Isatis arenaria*

(Kelebek otu) ve *Verbascum degenii* (Sığırkuyruğu) türlerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının alternatif doğal antimikrobiyal ajanlara sahip olduğunu ve bunun yeni ilaç geliştirilmesinde kullanılabileceği önerilmiştir.

Birkaç bitkiden elde edilen uçucu yağların, mikrobiyal gelişmeyi önlediği, aynı zamanda antioksidan aktivite gösterdiği ve süt ürünlerinde bu amaçla kullanılmak için iyi adaylar olduğu kabul edilmiştir (Bag ve Chattopadhyay, 2015; Chua ve ark., 2019 ve Tsai ve ark., 2011). Ayrıca, uçucu yağlar, ABD'de kullanım için onaylanmak üzere GRAS'a (genellikle güvenli olarak kabul edilen derece) sahip olma avantajına sahiptir (Dima ve Dima, 2015 ve Hartung, 2018).

Bu araştırmada kullanılacak olan kekik bitkisinin (*Thymus vulgaris*) sulu ekstraktının *S. aureus*'a (Nzeako ve ark., 2006), esansiyel yağının ise hem *S. aureus*'a (Pedonese ve ark., 2017) hem de MRSA'ya (Boskovic ve ark., 2015) karşı etkili olduğu gösterilmiştir. *Origanum vulgare* (Oregano) ve *Rosmarinus officinalis* (biberiye)'in esansiyel yağlarının *S.aureus*'a karşı inhibitör etkileri olduğu bildirilmiştir (Honório ve ark., 2015). Biberiye (*R. officinalis*) ayrıca tek başına etanol ekstraktı olarak ve sefuroksimle kombine halde MRSA'ya karşı araştırılmış ve kombinasyonun MRSA'ya karşı oldukça etkili olduğu ve ayrıca biberiyenin beta-laktamlara duyarlılığı artırmada anahtar bir rol oynadığı bildirilmiştir (Jarrar ve ark., 2010).

Yukarıda verilen bilgiler, bitkilerden alternatif antibakteriyel maddeler geliştirilebileceğini göstermektedir. Böylece mevcut çalışmada, her iki *S. aureus* suşuna karşı seçilen 2 bitkinin antibakteriyel özelliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

1.2. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*), Akdeniz bölgesine özgü, 2 m yüksekliğe kadar yaprak dökmeyen, birçok Avrupa ülkesinde ve ABD'de yetiştirilen bir çalı bitkisidir. Üst yüzeyinde yeşil, alt yüzeylerini beyazımsı yapan çok sayıda dallı tüy ile doğrusal

yaprakları vardır (Şekil 1.4). Soluk mavi, nadiren pembe veya beyaz çiçekler, yaprakların aksillerinde üretilen vertisillasterlerde taşınır. Yaprığın üst yüzü koyu yeşil, alt yüzü beyaz; yapraklar reçinelidir. Dallar, çatlaklı kabuk ve gövde ile sert, odunsu ve kahverengidir. Kimoza salkımına soluk mavi küçük çiçekler görünür. Yapraklar, çiçekli üst kısımlar ve ince dallar, geleneksel tıpta, modern tıpta ve aromaterapide olduğu kadar parfüm ve aroma endüstrilerinde de kullanılan esansiyel bir yağ ve oleoresin verir. Lamiaceae familyasına ait yaygın bir ev bitkisidir ve güçlü keskin aroması ve koyu yeşil uzun yaprakları ile en eski Akdeniz çalılarında biridir (Gachkar ve ark., 2007).

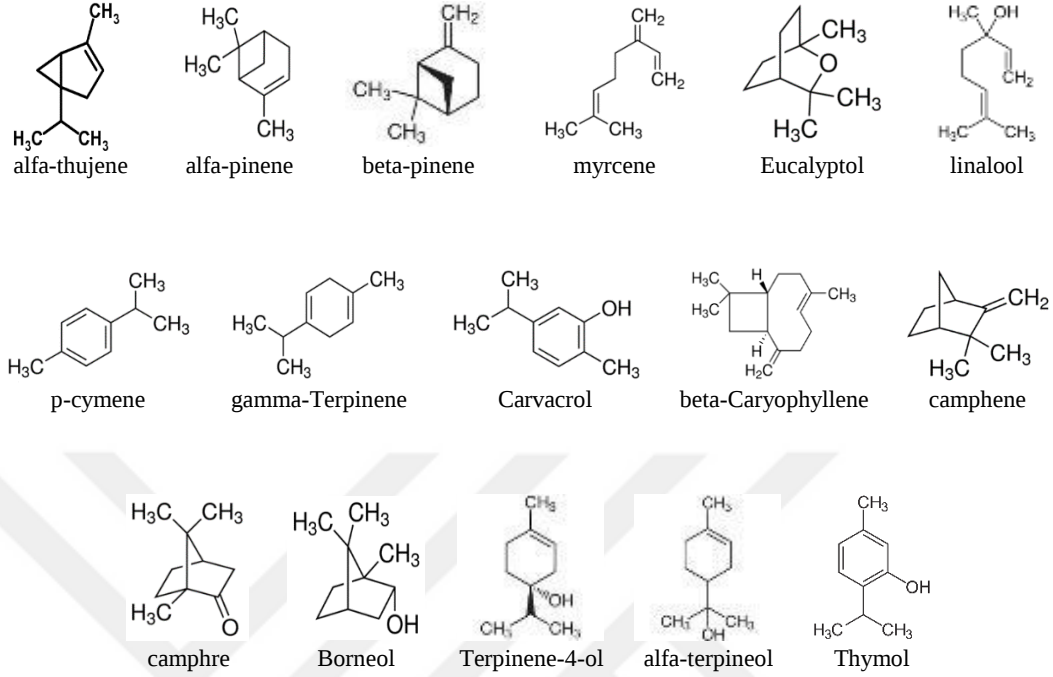


Şekil 1.4. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) bitkisi (Pravotorova, 2019).

Biberiye, yıllardır gıdalarda baharat ve doğal ilaç olarak kullanılmıştır. *Rosmarinus* adı, 'denizin çiyi' anlamına gelen Latince terimden türemiştir. Biberiye, antik Yunan ve Roma'dan beri bir anma sembolüdür. Yunanlılar otu hafızalarını güçlendirmek, kutsal otu yastığın altına yerleştirerek olumsuzlukları gidermek ve kabusları önlemek için kullanmışlardır. Sirkeye (marine) eklenen *R. officinalis* yaprakları, et, kabuklu deniz ürünleri ve sebzelerin hazırlanmasında beğenilen bir tatlandırıcı bileşen oluşturur. Bu bitki A vitamini, C vitamini, tiamin, riboflavin, B6 vitamini ve folat ile kalsiyum, magnezyum, demir, fosfor, potasyum ve bakır gibi önemli mineraller açısından zengindir. Karnosik asit ve karnosol (biberiye polifenol), antioksidan faz II enzimlerini kodlayan genler aracılığıyla prostat, deri, meme, lösemi, akciğer, mesane ve kolon kanserlerine karşı kemoprotektif, antioksidan ve antikanser aktiviteler sunar. Antiinflamatuvar olarak

karnosol, lökotrien göçünü azaltma, 5-lipoksijenazı inhibe etme, hücre içi Ca^{2+} mobilizasyonunu antagonize etme ve lökosit elastaz salgılanmasını inhibe etme yeteneğine sahiptir. Triterpenoid bileşik ursolik asidin anti-inflamatuar ve hatta antidepresan etkileri olduğu gösterilmiştir (Cheung ve Tai, 2007).

Biberiye esansiyel yağının kimyasal analizi, terpenlerin ve terpenoidlerin varlığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 1.5). Bu uçucu yağın ana bileşenleri arasında α -pinen, mirsen, 1,8-sineol, kafur, kamphen, α -terpineol ve borneol bulunur. *R. officinalis* yaprağının esansiyel yağı başlıca α -pinen, 1,8-cineole ve kafurdan oluşur ve masajda kullanıldığında kan basıncını ve solunum hızını artırır ve sempatik aktivite ile otonom sinir sistemini uyarıcı etkiye sahiptir. *R. officinalis* esansiyel yağı, lipid peroksidasyonunu sınırlayarak serbest radikal süpürme aktivitesi ve mükemmel hepatoprotektif özellikler sergiler. *R. officinalis* esansiyel yağından elde edilen 1,8-sineol, kan-beyin bariyerinden geçişi kolaylaştıran, reseptör bölgeleri üzerinde nöronal etki üreten veya fırçakuyruk sıçanındaki nöronların enzim aktivitesini etkileyen, yağda çözünen bir bileşiktir. Uçucu yağ, mükemmel antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve doğal bir koruyucu olarak saklama sırasında gıda ve cilt bakım ürünlerinin raf ömrünü uzatabilir (Borges ve ark., 2019).



Şekil 1.5. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) esansiyel yağının kimyasal bileşikleri.

R. officinalis ve bileşenlerinin, genotoksisiteyi (7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)-DNA eklentisi oluşumu) inhibe ederek deri ve meme kanserlerinde *in vivo* kimyasal önleyici özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Düşük kalselik vitamin D3 analogları ile kombinasyon halinde *R. officinalis*'ten elde edilen polifenolik preparasyon, altı ila sekiz haftalık dişi Balb/c farelerinde *in vivo* antilösemik aktivite göstermiştir (Moore ve ark., 2016). Biberiye ayrıca büzücü, spazmolitik, antiinflamatuvar, balgam söktürücü, gaz giderici, antiromatizmal, analjezik, antimikrobiyal ve hipotansif özellikleri nedeniyle tıbbi bir bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Biberiye yaprağının hazımsızlık, yüksek tansiyon ve romatizma tedavisinde kullanımı, Almanlar tarafından günde 4 ila 6 g dozlarda onaylanmıştır. Biberiyeye atfedilen diğer farmakolojik etkiler, antimutajenik, antikanser, hepatoprotektif ve antioksidan aktiviteleri içerir. Tarihsel olarak biberiye, çelenkler ve diğer aromatik tatil süsleri oluşturmak için kullanılan yaygın bir Noel bitkisiydi. Son zamanlarda, Noel süsleri için biberiye kullanımı bir rönesans geçirdi, çünkü birçok insan tatil dekorasyonları için geleneksel veya "eski moda" temaları

seçiyor ve böylece ev hayvanlarının bitkiye maruz kalma fırsatını artırıyor (Kontogianni ve ark., 2013).

Biberiye ayrıca böcek kovucu özellikleriyle tanınır ve gardıroplarda giysileri korumak için kullanılır. Ayrıca meyve bahçelerinde böcek kovucu bir bitki (fonksiyonel böcek ilacı) olarak da kullanılır. Budama ve şekillendirmeye karşı toleranslıdır, budama için uygundur ve değerli bir saksı bitkisidir. Biberiye, tarla bitkisi veya i mekn bitkisi olarak yetiştirilebilir. Bitki, ılık ve güneşli havalarda pH 6,5–7,0 olan iyi drene edilmiş topraklarda iyi gelişir. Yarı kurak bir tropik iklimde de büyüyebilme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, bitki şiddetli soğuğa ve dona karşı hassastır, ancak artık dona dayanıklı eitleri de geliştirilmiştir (Heidari-Vala ve ark., 2013).

Günümüzde biyoaktif bitki ürünlerinin antibiyotik etkinliğinin artırılmasına artan bir ilgi vardır ve mikroorganizmalara karşı etkinliğini artırmak için çok sayıda çaba sarf edilmiştir. Biberiye esansiyel yağının tetrasiklin, gentamisin, sulfonamid-trimetoprim, kloramfenikol, sefepim ve tetrasiklin ile etkisi hakkında yapılan araştırmalar *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı sinerjik bir etki göstermiştir (Nieto ve ark., 2018). Biberiye esansiyel yağı üzerine yapılan son çalışmalar, çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesine odaklanmıştır. Bu uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi hakkında bazı raporlar vardır. Örneėin, Jiang ve ark. (2011) biberiye esansiyel yağının *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı çok etkili olduğunu göstermişlerdir; MİK değerlerinin tüm test mikroorganizmaları için %0,03 (h/h) ila 1,0 (h/h) arasında olduğu bildirilmiştir. Diėer araştırmalarda da biberiye esansiyel yağının *S. aureus*'a karşı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Örneėin, α -pinen, *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 35218 ve *Klebsiella pneumoniae*'yi 0,8 ila 8 μ L/mL aralığındaki MİK ile inhibe edebilmiştir (Nikolić ve ark., 2016). Biberiye esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitelerinin α -pinen ve 1,8-sineole göre daha üstün olduğu gösterilmiştir. Bir uçucu yağın antimikrobiyal etkisini bir veya birkaç aktif bileşiğe bağlamak zordur, çünkü ekstraktlar farklı biyolojik özelliklere sahip farklı kimyasal

bileşiklerin bir karışımıdır (Celiktaş ve ark., 2007). Biberiyenin gıdalarda farklı uygulamaları vardır. Örneğin hayvansal ürünlere ve yağlara eklenmiştir. Farklı çalışmalar, biberiyenin, karotenoidlerin renk kaybını azaltarak ve yağlarda ve et ürünlerinde lipid oksidasyonunu geciktirerek güçlü aktivite göstermiştir. Öte yandan, biberiye özü hayvan diyeti yoluyla uygulanabilir (Okoh ve ark., 2010).

Antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının yaygınlaşması ve tüketicilerin haklı endişeleri, diğer AB üyesi olmayan ülkeleri, antibiyotiklerin gelişmeyi artırıcı olarak kullanımına ilişkin AB direktiflerini takip etmeye sevk etmiştir. Bu, gıda endüstrisi üzerindeki yeterli alternatifleri bulma baskısını artırmıştır. Hayvan beslemede antibiyotikler yerine probiyotikler, şifalı otlar, prebiyotikler ve organik asitler de kullanılabilmektedir (Oluwatuyi ve ark., 2004 ve Wang ve ark., 2012).

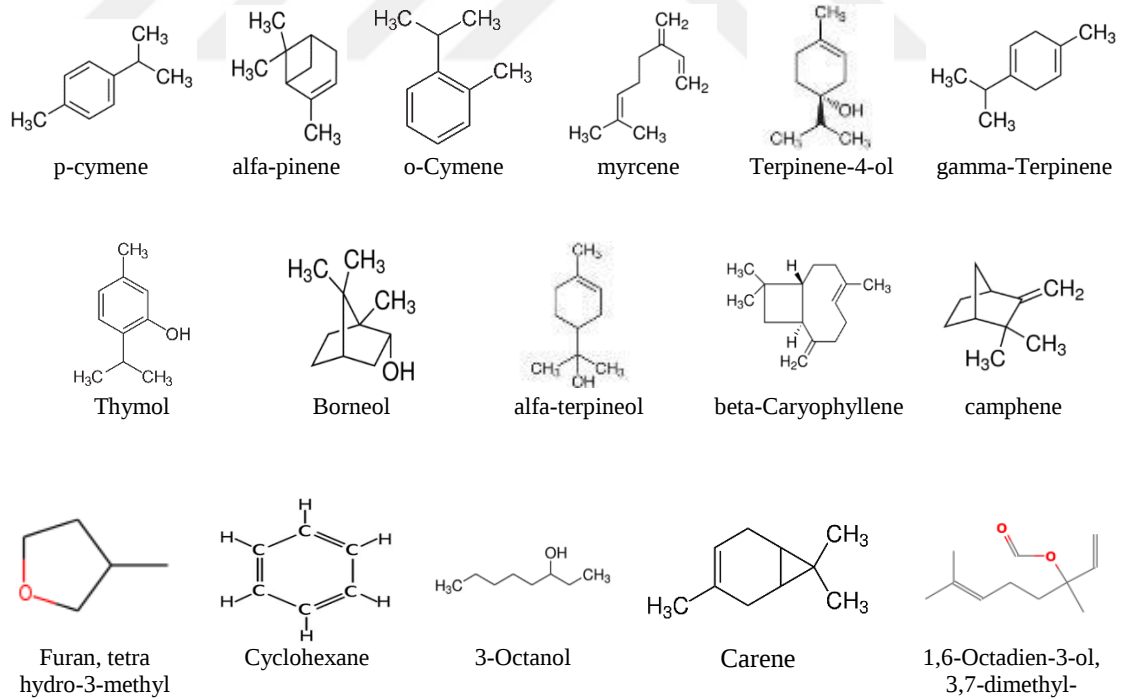
1.3. Kekik (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris, Batı Akdeniz'den güney İtalya'ya kadar güney Avrupa'ya özgü nargillerden Lamiaceae'de bulunan çiçekli bir bitki türüdür. Küçük, oldukça aromatik, gri-yeşil yaprakları ve yaz başında mor veya pembe çiçek salkımları olan gür, odunsu tabanlı, yaprak dökmeyen bir alt çalıdır (Şekil 1.6) (Christopher, 2008). Kekik, ılıman ve sıcak, kuru, güneşli iklimlerde ve gölge alanlarda her yerde iyi yetişir. Kekik türleri, birkaç alternatif bitki için uygun olmayabilecek kaba topraklarda da iyi gelişebilir (bioweb.uwlax.edu).

T. vulgaris'ten elde edilen uçucu yağ, yüksek oranda oksijenli monoterpen içeriği (%56,53) ve düşük monoterpen hidrokarbon içeriği (%28,69), seskiterpen hidrokarbon (%5,04) ve oksijenli seskiterpen (%1,84) göstermiştir (Şekil 1.7). Uçucu yağ bileşenleri arasında baskın bileşik timol (%51,34) iken, yağın diğer tüm bileşenlerinin miktarı %19'dan azdır (Maher ve ark., 2011).



Şekil 1.6. Kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisi (Chauvet, 2016).



Şekil 1.7. Kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağının kimyasal bileşikleri.

Kekik antiseptik, antibakteriyel, b          , gaz giderici, dezenfektan ve tonik olarak kullanılmıştır. Ayrıca kancalı kurt, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler gibi          bağırsak enfeksiyonları ve istilası durumlarında da yararlı olabileceği belirtilmiştir. Aktif bileşeni olan timol, koksidiyoza kar  şı da etkili olabilmektedir. Kekik ayrıca karaciğer fonksiyonlarını düzenleyebilmekte ve iştahı artırmak amacıyla da değerlendirilmektedir. Kıkırdak, bronşiyal ve üriner enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (Amiri, 2012). Kekik, larenjit ve iltihap tedavisinde de yararlı olabilmektedir. Ya  lı cilt, siyatik, akne, dermatit, cilt hasarı ve böcek ısırıkları gibi cilt sorunları için kullanılır. Aroma terapide, antiviral özellikler için çok hafif yumuşak etkisi nedeniyle timol, ‘‘kırmızı kekik yağı’’, linalool türü farklı türleri kullanılır. Düzeltilmiş bir ürün olan ‘‘beyaz kekik ya  ı’’ da kullanılır ve cilt üzerinde daha yumuşaktır. Cilde uygulanan kekik, ısırık ve sokmalardan kaynaklanan ağrılarla nevrojji ve romatizmal acı ve ağrıları giderir (ESCOP, 2007).

Thymus vulgaris'ten elde edilen uçucu yağlar, biyolojik aktiviteleri ve kimyasal bileşenleri açısından değerlendirilmiştir. Kekik uçucu ya  ları, 9 Gram negatif bakteri su  una ve 6 Gram pozitif bakteri su  una kar  şı inhibisyon etkileri açısından analiz edilmiştir. Uçucu yağların antibakteriyel aktivitesini tespit etmek için biyo-empedans metodolojisi seçilmiş ve ayrıca kekik ya  larının antibakteriyel aktivitesini ana hatlarıyla belirtmek ve ölçmek için seçilen parametre tespit süresi olmuştur. Plaka sayma tekniği, doğrudan maruz bırakma yoluyla engelleyici etkiyi incelemek için kullanılmıştır. İncelenen tüm kekik uçucu ya  ları, test edilen mikroorganizmalara kar  şı önemli bakteri statik aktivitesine sahiptir. Bu aktivite, Gram pozitif bakterilere kar  şı ek olarak işaretlenmiştir. Kekikten elde edilen ya  , incelenen mikroorganizma türlerinin büyümesini durdurmada en etkiliydi. Test edilen yağların, doğrudan temas yoluyla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterildi ve bu durumun Gram-negatif mikroorganizmaya kar  şı çok fazla etkili olabileceği izlenimi vermiştir. Bazı türler, inhibitör ile temas ettiklerinde metabolik fonksiyonlarının en az %50'sini geri kazanma yeteneğine sahipken, su  ların çoğunun neredeyse tamamen inaktive olduğu gösterilmiştir (Marino ve Bersani, 1999).

Thymus vulgaris L. (Lamiaceae), güney Avrupa ve Akdeniz'e özgü, yaprak dökmeyen bir bitkidir (Gillett, 1998). Bitki, eski çağlardan beri peynirlere (Akarca ve ark., 2016 ve Aygun ve ark., 2005) ve likörlere (Karabegovic ve ark., 2012 ve Martinez-Francés ve Rios, 2005) lezzet katmak için kullanılmaktadır. Tavşan, domuz ve kuzu gibi etleri tatlandırmak için kullanılır (Cornara ve ark., 2000). Ticari *T. vulgaris* uçucu yağlarının ana bileşenlerinin timol (%23-60), gama-terpinen (%18-50), p-simen (%8-44), karvakrol (%2-8) ve linalool (%3-%4) olduğu bildirilmiştir (Duke, 1992). *T. vulgaris* yağının yanı sıra yalnız başına timol de antibakteriyel, antifungal ve anti-inflamatuar etkiler göstermiştir (Basch, 2004).

Kekik esansiyel yağlarının kimyasal bileşimleri ve farmasötik özellikleri, halihazırda kırmızı et ve tavukta olduğu gibi gıdaların muhafazasında kullanılmaktadır (Barbosa ve ark., 2009 ve Fratianni ve ark., 2010). Bununla birlikte, mevsimsel değişikliklerin, uçucu yağların bileşimini ve bitkilerin farmasötik özelliklerini etkileyebileceğini belirtmek önemlidir.

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve Kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağının sergilediği antibakteriyel aktivite, birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir, ancak ne yazık ki, uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili çok az kantitatif veri (MİK veya MBK değerleri) vardır. Bu nedenle, bu çalışma Biberiye ve Kekik uçucu yağlarının *S. aureus* gıda kaynaklı patojenin hayatta kalması ve büyümesi üzerindeki “*in vitro*” etkinliğini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu sonuçlar, uçucu yağların gaz kromatografi karakterizasyonuna göre hangi bileşenlerin antimikrobiyal aktiviteye katkıda bulunabileceğinin çıkarılmasına ve bileşenler ile antibakteriyel aktiviteleri arasındaki herhangi bir ilişkinin belirlenmesine izin verecektir.

1.4. Amaçlar ve hedefler

Mevcut literatür göz önüne alındığında sütlerde *S. aureus* kontaminasyonunun yaygın olması, ayrıca MRSA suşlarının gittikçe artması mastitisli ineklerin sütlerinde de bu bakterinin bulunabileceğini ve sahadan toplanan bitkilerin ekstraktlarının bu türden bakterilere yönelik etkilerinin olabileceğine yönelik bir hipotez kurulmuştur.

Yapılan literatür taramalarında bilgilerimize göre Türkiye’de süt inekçiliğinde metisiline dirençli *S. aureus*’ın sıklığına yönelik sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Dolayısıyla Ankara ve çevresinde sütçülük işletmelerinden toplanan çiğ sütlerde *S. aureus* insidansını belirlemek ve bu suşları tiplendirmek, *S. aureus* izolatlarının hangi antibiyotiklere duyarlı veya dirençli olduğunu tespit etmek ve bunlara karşı kullanılabilecek alternatif bitkisel maddelerin antibakteriyel etkinliğini araştırmak çalışmanın özgünlüğünü göstermektedir.

Böylece bu çalışmada öncelikle Ankara’da faaliyet gösteren sütçülük işletmelerinden toplanan sütlerde *S. aureus* insidansı belirlenmiş ve virülans belirteçlerinin varlığı ve kontamine sütün durumu hakkında bilgi edinilmiştir. Yapılan literatür taramasında bu konuyla ilgili sınırlı sayıda araştırma olduğundan ayrıca tespit edilen *S. aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere dirençli olup olmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca sahadan izole edilen MRSA suşlarına karşı seçilen iki bitki çeşidinin etanolik ekstraktı kullanılarak MIK değerleri belirlenmiş ve MRSA suşlarına karşı alternatif bitki çeşitlerinin kullanılıp kullanılmayacağı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

Dolayısıyla bu çalışma 3 önemli amaca hizmet etmektedir.

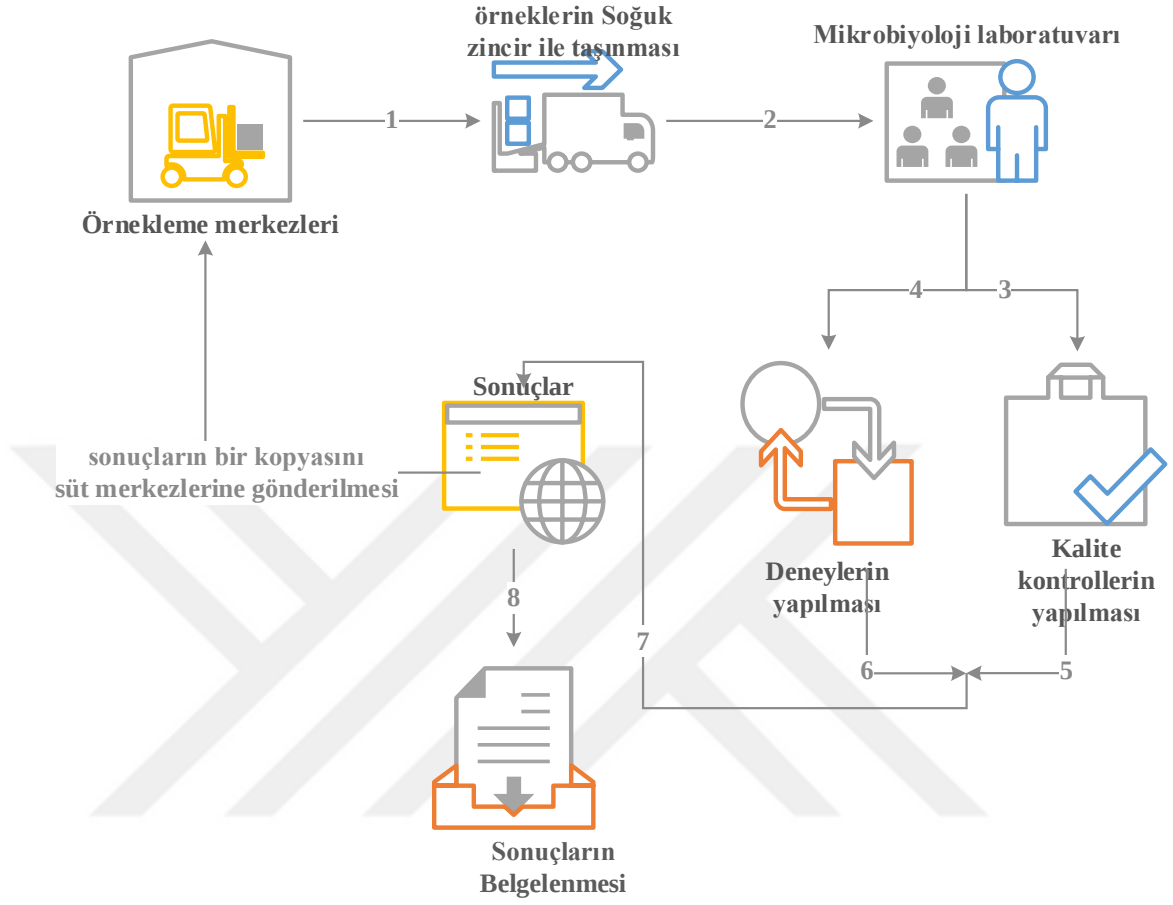
1. Sütçülük işletmelerinden toplanan çiğ sütlerde *S. aureus* sıklığını belirlemek,
2. Tespit edilen *S. aureus* izolatlarının seçilen antibiyotiklere duyarlılık veya dirençlilik durumunu tespit etmek,
3. Dirençli *S. aureus* suşlarına ve özellikle MRSA’ya karşı bitkisel ekstraktlar kullanılarak alternatif antibakteriyel etkilerini araştırmak

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Örnekleme

Süt ineklerinden Haziran 2019 ile Aralık 2020 arasında yaklaşık 1000 hayvandan CMT+ olan toplam 150 çiğ süt numunesi alındı. Numuneler Ankara'nın farklı bölgelerinden toplandı. Süt numunesi tüm aktif laktasyondaki loblardan toplanmıştır, bu nedenle her numune bir ineğin tüm lobları için kullanılmıştır. Antibiyotik uygulaması yapılmayan ancak subklinik mastitisli inekler örnekleme dahil edilmiştir. Tüm numuneler, soğuk zincirde (4°C'de) ve uluslararası resmi standartlara göre laboratuvara getirilmiştir.

Materyal olarak Ankara'da süt inekçiliği yapılan çiftliklerde bulunan, 3-7 yaşlı, Holştein ve Holştayn melezi ırkı ineklerde klinik muayenede mastitisli olmadığı, ancak California Mastitis Testi (CMT) ile enfeksiyonun varlığını ve şiddetini gösteren karışımın pıhtılaşma ve viskozitesinin doğasına dayanarak subklinik mastitisli olduğu belirlenen 150 hayvan ve bunlara ait 600 meme lobu kullanıldı. Subklinik mastitis tespit edilen ancak antibiyotik uygulanmayan ineğin her lobundan alınan sütler havuzlanarak bir numune olarak kullanıldı. Test için CMT kabının gözlerine her memeden yaklaşık 2 ml süt alınarak üzerine yaklaşık aynı miktarda ayıraç eklendi. Test skoru herhangi bir değişiklik göstermeyen, gri renk ve pıhtılaşmayan kısım negatif, eşik değeri (+) ve daha üstü olanlar ise pozitif olarak kabul edildi. Çalışma için en az bir lobunda pozitiflik olan ineklerin sütü toplandı. 150 subklinik mastitisli ineğin tespit edilmesi ve bunlardan numune alınması için yaklaşık 1000'e yakın inek taranmıştır. Şekil 2.1'de araştırmada alınan yol kısaca açıklanmıştır.

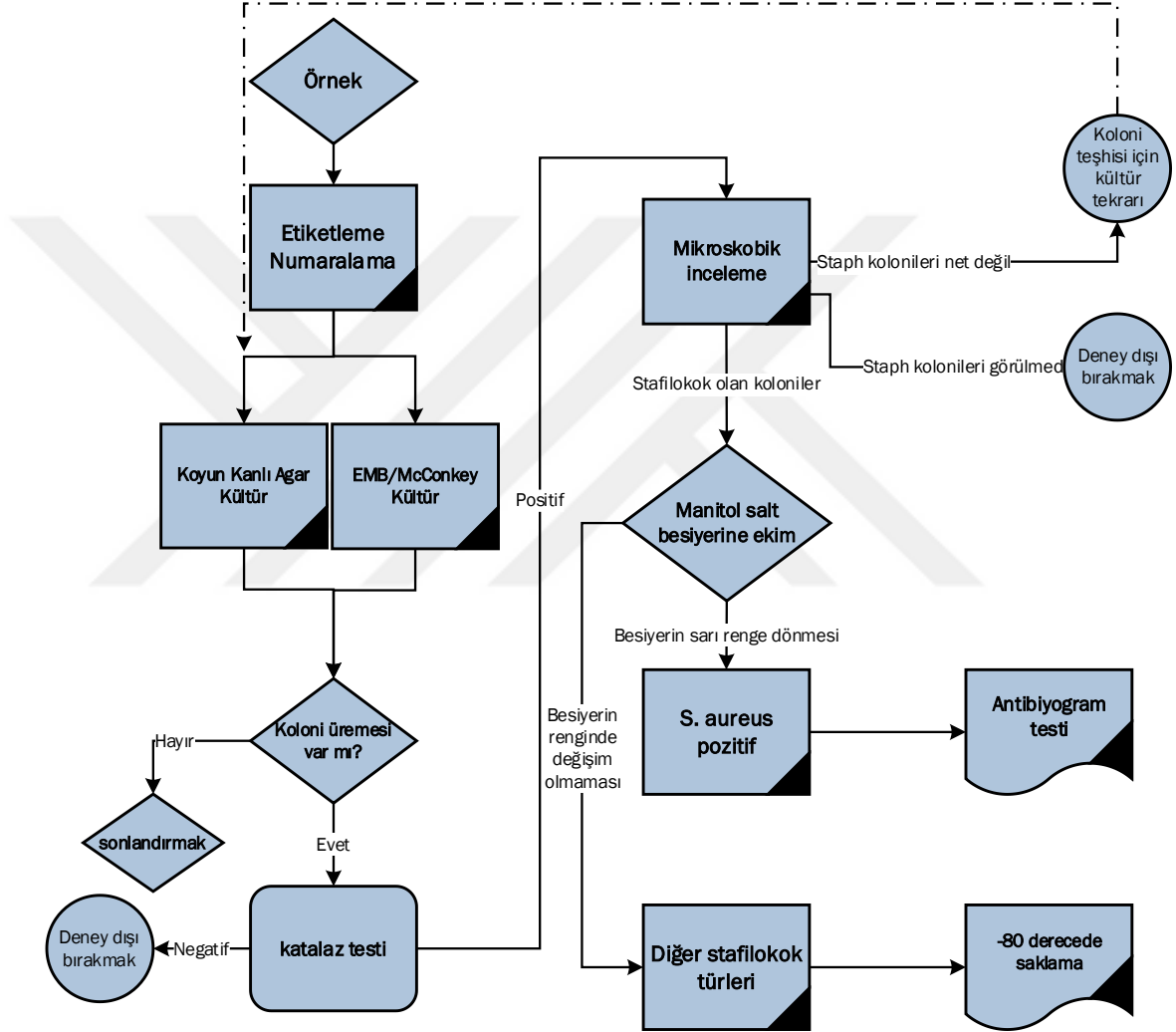


Şekil 2.1. Araştırmada yapılan işlemlerin akış şeması.

2.2. *Staphylococcus aureus*'un izolasyonu ve tanımlanması

Bakterilerin izolasyon işlemi agar plak yöntemiyle gerçekleştirildi (Herigstad ve ark., 2001). *S. aureus*'un izolasyon ve tanımlama prosedürü Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Örnekler seri olarak seyreltilerek (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) koyun kanlı agar (Merck, Almanya) besiyeri içeren plakların yüzeyine 0,1 ml aktarıldı. Bakterilerin morfolojik özelliklerini ve saf kültür olup olmadığını kontrol etmek için her bir koloninin sürüntüsü cam lam üzerine konuldu ve Gram boyama yöntemine göre boyandı. Örneklerin bakteri morfolojisini kontrol etmek için optik mikroskopi kullanıldı. Koyun kanlı agar ortamından elde edilen tüm suşlar, Reiner (2010) tarafından tarif edildiği gibi katalaz testine tabi tutuldu. Ayrıca

saf olarak saptanan tüm stafilokok suşları arasından *S. aureus* türleri izole etmek için bakteri süspansiyonları Mannitol tuzlu agar (MS agar, Merck, Almanya), kromojenik besiyeri seçici ortam olarak kullanıldı.

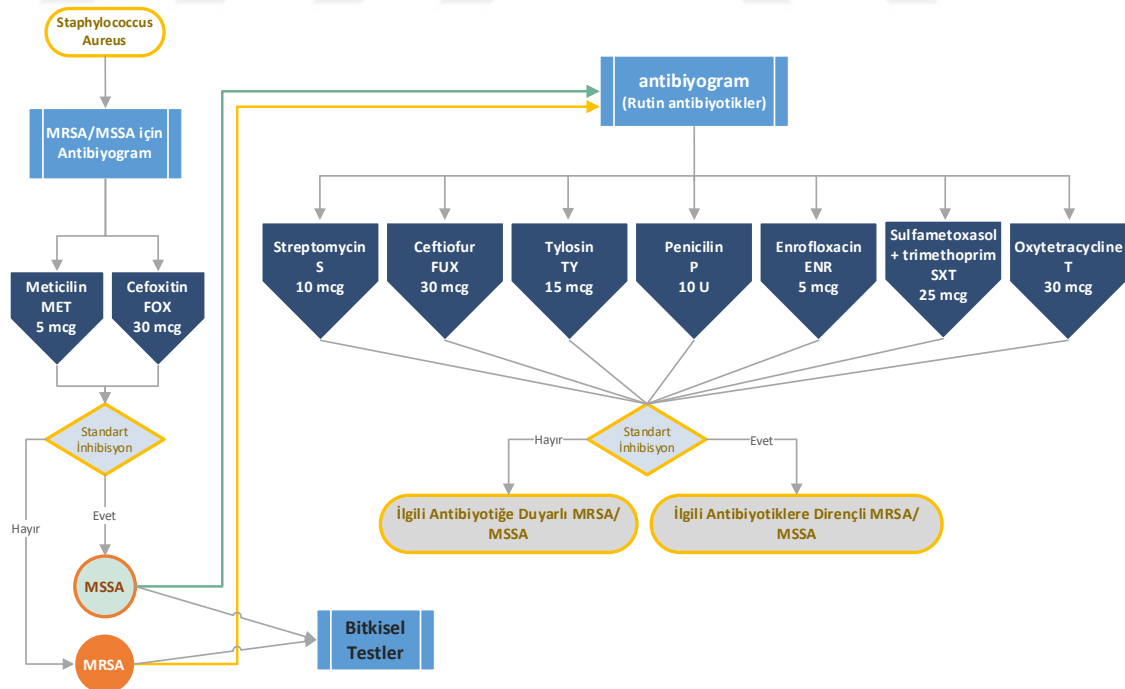


Şekil 2.2. Süt örneklerinde *S. aureus* izolasyonu ve tanımlama prosedürü.

2.3. *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

İnek çiğ sütlerinde bulunan izolatların sık kullanılan çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ve dirençleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'ne (CLSI, 2020) göre (Şekil 2.3) kullanıldı. Kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 standart suşu kullanıldı. Mueller-Hinton agar plakaları, her suşun bir süspansiyonu (0,5 McFarland standardına eşdeğer olarak) ile inoküle edildi.

Antibiyotik direncinin tespiti için dokuz antibiyotik diski, metisilin (5 µg), sefoksitin (30 µg), streptomisin (10 µg), seftiofur (30 µg), tylosin (15 µg), penisilin G (10 U), enrofloksasin (5 µg), sülfametoksazol-trimetoprim (25 µg) ve oksitetrasiklin (30 µg) kullanıldı. MSSA ve MRSA suşları üzerindeki antibiyogram prosedürü Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Antibiyotik seçimi stratejisi, veterinerlik ve tıpta *S. aureus* ile ilişkili enfeksiyonların birinci basamak tedavisinde önemlerine, inhibitör etkilerine ve sık kullanımlarına dayanmaktadır. Tüm antibiyotik diskleri bir disk dispenser kullanılarak Mueller-Hinton agar üzerine yerleştirildi ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi.



Şekil 2.3. *S. aureus* suşlarında MRSA ve MSSA türlerinin belirlenmesi ve antibiyogram değerlendirmesi.

2.4. Bitkilerin toplanması, analize hazırlanması ve ekstraksiyonları:

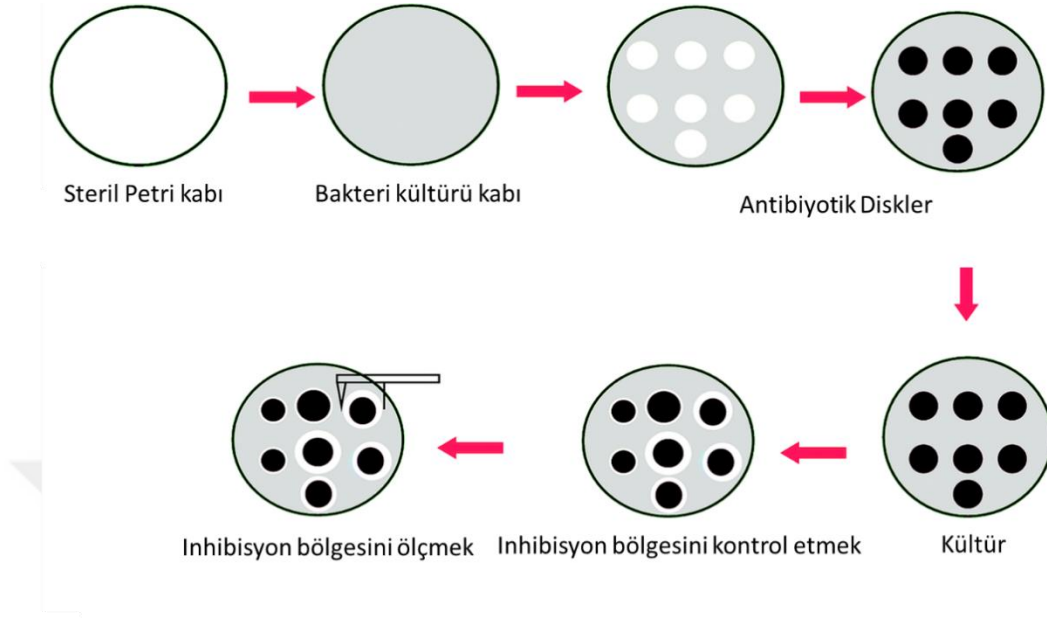
Kullanılan bitkiler kekik ve biberiye yaprakları Toros dağlarında toplayıcılık yapan Antalya’lı köylülerden yeni hasat edilenlerden (Nisan ayında) satın alındı ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde teşhis edildikten sonra yaprakları doğrudan güneş ışığına maruz kalmaksızın oda ısısında kurutuldu. Antibakteriyel etkinlik için bitkinin incelenen bölümleri toz haline getirildi ve 100 g bitki örneği Avrupa Farmakopesi'ne göre 2,5 saat süreyle 3 L distile suyla Clevenger tipi aparat kullanılarak hidro-distilasyon metoduyla (artık hiçbir uçucu yağ elde edilmeyene kadar) ekstrakte edildi. Esansiyel yağlar %10 dimetildülfoksit (DMSO) ile çözündürüldü ve membran filtreler (0,45 µm) yardımıyla sterilize edildi. Ekstraktlar susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu ve deneysel işlemlere kadar -21°C'de saklandı. Biberiye ve kekik yapraklarının uçucu yağ verimleri sırasıyla %1,9 ve %0,2 olarak ölçüldü. Antibakteriyel etkinlik için disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanıldı (Bauer, 1966).

2.5. Ekstraktların kompozisyon analizleri:

Uçucu yağların analizi, PTV enjeksiyon portu ve Thermo Finnigan Polaris Q iyon tuzak-kütle spektrometrik dedektör bağlı Gaz kromatografiyle yapıldı (elektronik impakt, iyon source sıcaklığı, analiz kütle aralığı ve arayüz sıcaklığı sırasıyla 70 eV, 230 °C, 50-650, 280 °C). Ayırım için DB-5MS kapiler kolonu (30mm × 0,25mm id; film kalınlığı 0,25µm) kullanıldı. Taşıyıcı gaz olan helyum (saflık %99,9) 1,2 mL/dk akış hızında tutuldu. Enjektör ve dedektör MS transfer hattı sıcaklıkları sırasıyla 160 ve 265°C olarak ayarlandı. Fırın sıcaklığı başlangıçta 80°C'de 2 dk tutuldu, dk'da 10°C artarak 200°C'ye sonra dk'da 6°C artarak 280°C'ye getirildi ve burada 35 dk tutuldu. Bileşenler, alıkonma sürelerinin ve kütle spektrumlarının standartları ile (ana bileşenler için), GC-MS sisteminin NIST kitaplığı verileriyle ve literatür verileriyle karşılaştırılmasıyla tanımlandı. Bu işlem için hizmet satın alımı yapıldı.

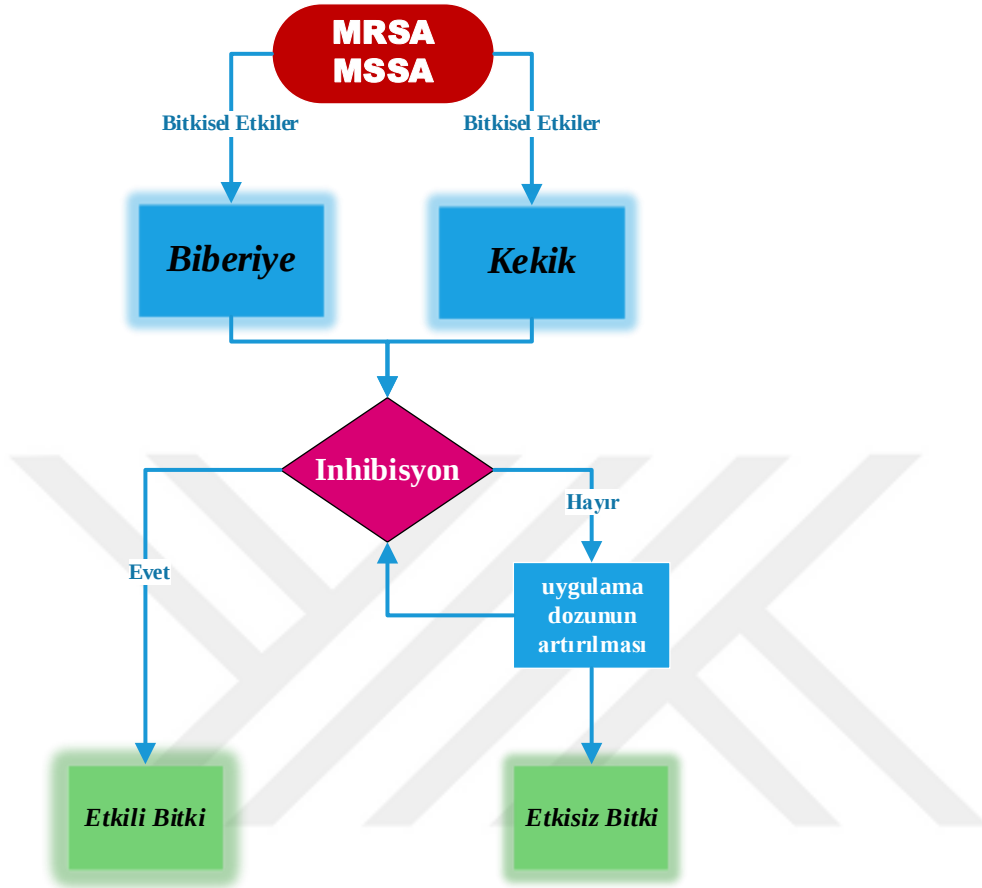
2.6. Disk Difüzyon Yöntemi

Antimikrobiyal duyarlılık testi için disk difüzyon yöntemi, seçilen bitki ekstraktlarının antibakteriyel özelliklerini değerlendirmek için Kirby-Bauer disk difüzyon standart test yöntemine (Hudzicki, 2009) göre gerçekleştirildi. 0,5 McFarland test standardı kullanılarak, izolatların her birinin bakteri süspansiyonları türbidometrik olarak hazırlandı ve konsantrasyonu 0,600 OD (450 nm) olarak ayarlayan bir spektrofotometre ile ölçüldü ve steril bir swab kullanılarak MHA plakalarını eşit şekilde ekildi. Seçilen antibiyotik diskleri ve bitki ekstraktları emdirilen diskler, önceden hazırlanmış bakteri süspansiyonlarının pamuklu çubukla yayıldığı MHA yüzeyine yerleştirildi. Standart ticari antibiyotik diskleri metisilin (5 µg), sefoksitin (30 µg), streptomisin (10 µg), seftiofur (30 µg), tilosin (15 µg), penisilin G (10 U), enrofloksasin (5 µg), sülfametoksazol-trimetoprim (25 µg) ve oksitetrasiklin (30 µg) Bioanalysis®, Türkiye), bitki ekstraktları, bitki ekstraktının çözücüsü olarak %10 DMSO ve negatif kontrol olarak steril distile su gömülü diskler agar plaklarına konuldu ve aerobik koşullar altında 18 ila 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaklardaki disklerin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapı bir kumpas kullanılarak ölçülerek antibiyotik ve ekstraktların inhibisyonu açısından incelendi ve kaydedildi. Güvenilirliği sağlamak için testler üç kez tekrarlandı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Seçilen antibiyotikler ve bitki özlerinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesi.

Bitki ekstratlarının MSSA ve MRSA suşlarına inhibitör etkilerinin değerlendirilmesi şekil 2.5 te sunulmaktadır.

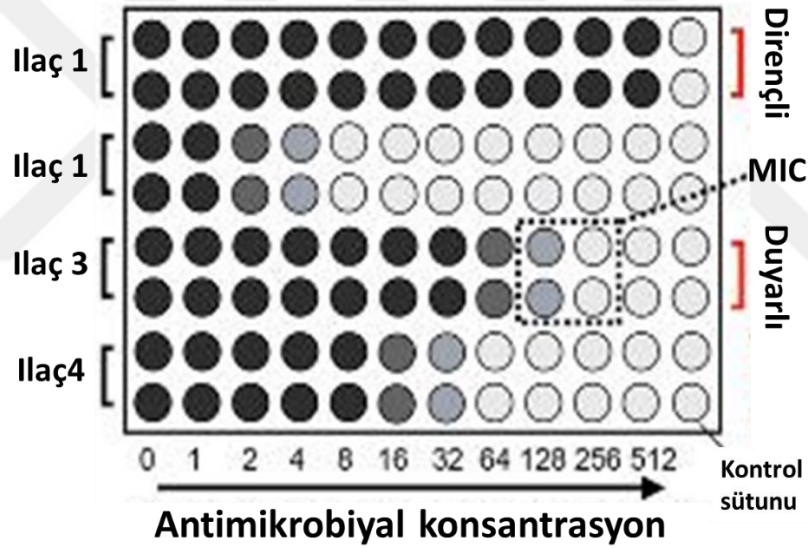


Şekil 2.5. Bitki ekstratlarının MSSA ve MRSA suşlarına inhibitör etkilerinin değerlendirilmesi.

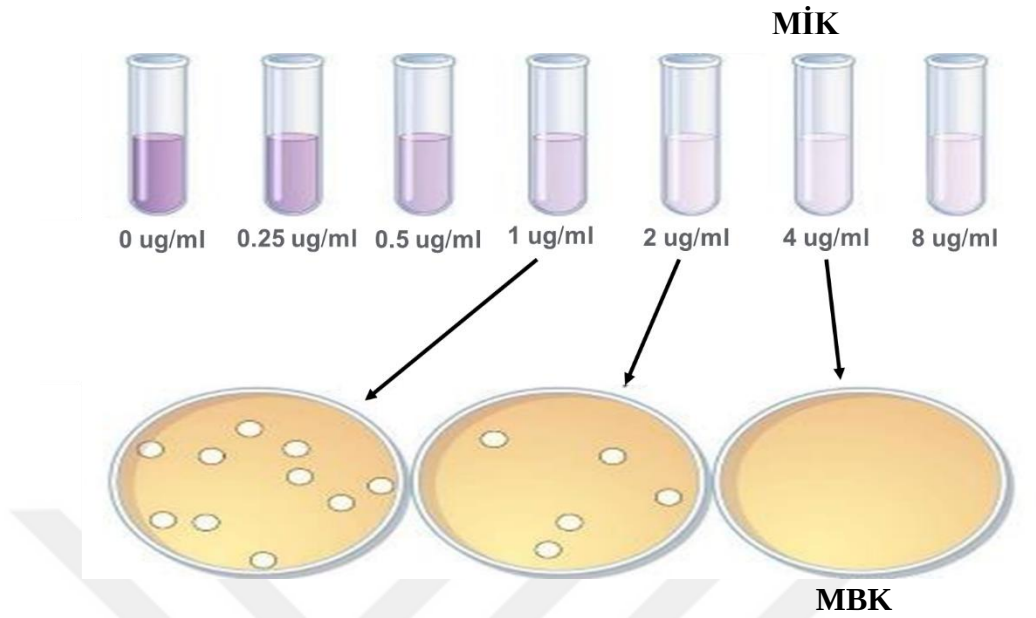
2.7. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi:

Tüm *S. aureus* izolatları, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kılavuzlarında belirtildiği gibi mikrodilüsyon testi kullanılarak MİK için test edildi (Arendrup ve ark., 2017). Bitkisel ekstratların çözücüsü olarak %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO), antibakteriyel etki göstermedi. İnokulumlar inkübe edilerek gecelik kültürler hazırlandı ve 0.5 McFarland standardına göre ayarlandı. Daha sonra, 96 kuyucuklu mikropalaklarda Mueller–Hinton broth (MHB, Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) kullanılarak 256 µg/mL'den 0,25 µg/mL'ye kadar konsantrasyonlarda seri seyreltmeler

yapıldı. Bakteri süspansiyonu (0,5 McFarland standardına göre), 24 saatlik bir kültür plakasında hazırlandı. Bu süspansiyondan her kuyucuğa 100 µL inoküle edildi. Her suş için bir sterilit kontrol kuyusu ve bir büyüme kontrol kuyusu da tutuldu. Son kuyu (negatif kontrol), sadece herhangi bir esansiyel yağı içermeyen MHB içeriyordu. Toplam hacim her kuyuda 200 µL idi. Plakalar 37°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edildi. MİK son noktası, kuyuda görünür bir büyümenin olmadığı en düşük özüt konsantrasyonudur. MBK son noktası, MHA'da görünür bir büyümenin gözlemlenmediği MRSA popülasyonunun %99, 9'undan fazlasını öldürme yeteneğine sahip bir özütün en düşük konsantrasyonudur (Şekil 2.6 ve 2.7).



Şekil 2.6. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK).



Şekil 2.7. Mikrodilüsyon yöntemiyle minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK).

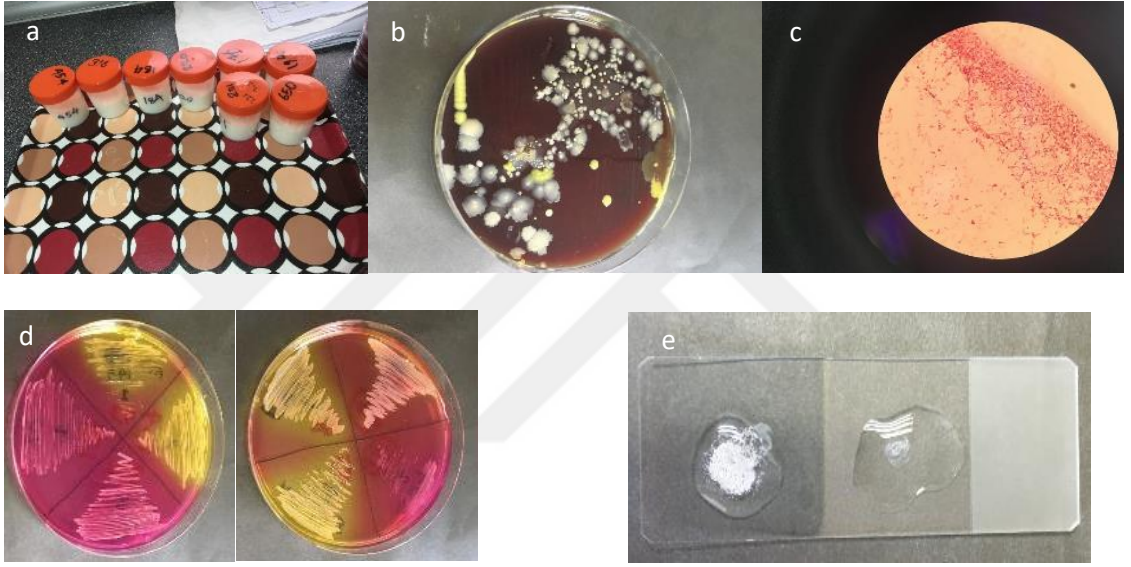
2.8. İstatistiksel analizler

Tüm sonuçlar, üç bağımsız deneyde üç kopya halinde yapıldı ve elde edilen nicel veriler, sonuçların ortalaması olarak ifade edildi. Farkların belirlenmesi için istatistiksel ANOVA testi ($p < 0,05$), ardından Tukey testi kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* suşlarının izolasyonu

Besiyerine ekimi yapılan çiğ sütlerde üreyen *S. aureus* suşları ve bunun için kullanılan prosedür Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. (a) süt numunesi hazırlama, (b) ilk bakteri kültürü, (c) *S. aureus*'un mikroskopik görünümü, (d) *S. aureus* ve diğer stafilokoklar olarak kültürel büyüme, (e) *S. aureus* numunelerinin (+) katalaz testi.

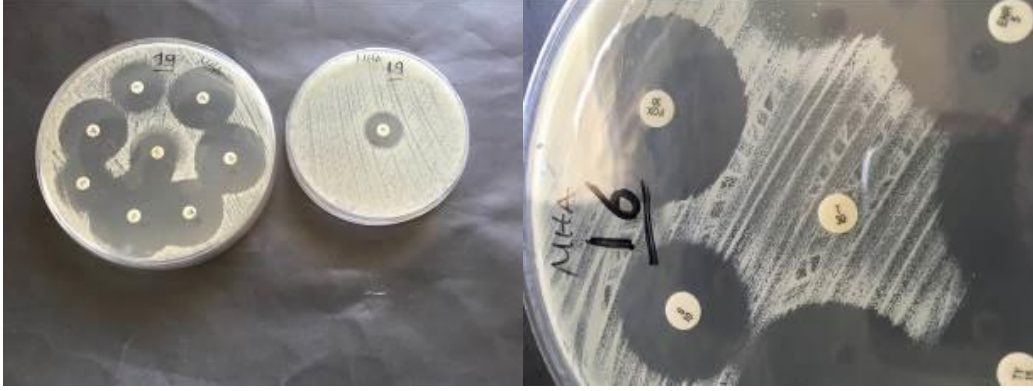
Yapılan analizlerde 150 subklinik mastitisli inekten alınan sütlerde 26 örnek *S. aureus* için pozitiflik (%17,33) gösterdi. Pozitif numunelerin 20’si MSSA ve 6’sı MRSA olarak tespit edildi. Böylece subklinik mastitisli ineklerin %13,33’ünde MSSA ve %4’ünde MRSA izole edildi.

3.2. Antimikrobiyal duyarlılık testi (AST)

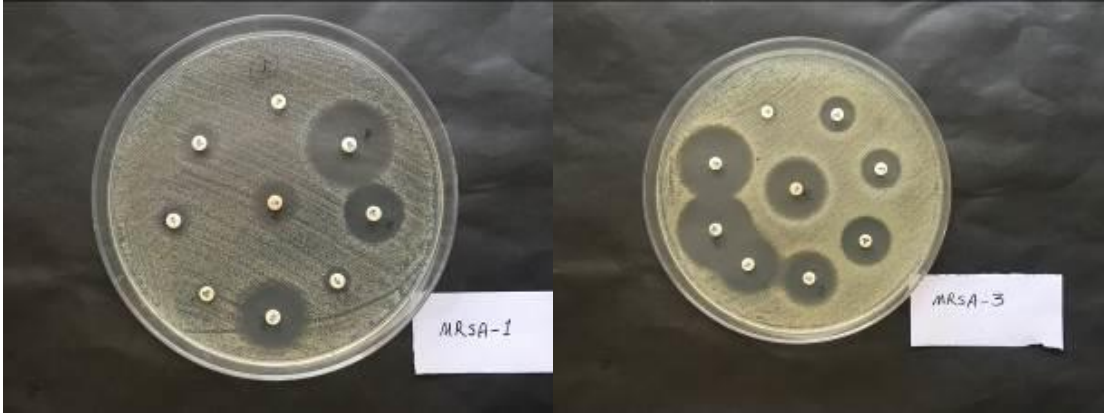
Çizelge 3.1 ve 3.2’de çiğ süttten elde edilen MSSA ve MRSA izolatlarına karşı dokuz antibiyotığın antibakteriyel duyarlılıkları gösterilmiştir. Tüm MSSA izolatları sefoksitin (30 µg), seftiofur (30 µg), penisilin G (10 U) ve enrofloksasine (5 µg) karşı tam duyarlılık gösterirken, bazı izolatlar metisilin, streptomisin, tilosin (15 µg) ve sülfametoksazol-trimetoprim’e orta düzeyde duyarlılık göstermiştir. Ayrıca oksitetrasiklin için en yüksek direnç seviyesi tespit edildi (izolatların %15’i dirençli ve %40’ı orta düzeydeydi) (Şekil 3.2). Öte yandan, tüm MRSA örnekleri metisilin ve penisiline karşı tam direnç sergiledi (Şekil 3.3).

Çizelge 3.1. Disk difüzyon yöntemi ile test edilen çiğ süt örneklerinden izole edilen metisiline duyarlı *S. aureus*’un (MSSA) antimikrobiyal duyarlılık paternleri.

Antibiyotik	Test edilen izolat sayısı	Antibiyogram deseni		
		Duyarlı (%)	Orta düzey (%)	Dirençli (%)
Methicillin (5 µg)	20	18 (90)	2 (10)	-
Cefoxitin (30 µg)	20	20 (100)	-	-
Streptomycin (10 µg)	20	19 (95)	1 (5)	-
Ceftiofur (30 µg)	20	20 (100)	-	-
Tylosin (15 µg)	20	18 (90)	2 (10)	-
Penicillin (10 U)	20	20 (100)	-	-
Enrofloxacin (5 µg)	20	20 (100)	-	-
Sulfamethoxazole-Trimethoprim (25 µg)	20	19 (95)	1 (5)	-
Oxytetracycline (30 µg)	20	9 (45)	8 (40)	3 (15)



Şekil 3.2. MSSA antibiyogramları.



Şekil 3.3. MRSA türlerinin antibiyogramları.

Çizelge 3.2. Disk difüzyon yöntemi ile test edilen çiğ süt örneklerinden izole edilen metisiline dirençli *S. aureus*'un (MRSA) antimikrobiyal duyarlılık paternleri.

Antibiyotik	Test edilen izolat sayısı	Antibiyogram deseni		
		Duyarlı (%)	Orta düzey (%)	Dirençli (%)
Methicillin (5 µg)	6	-	-	6 (100)
Cefoxitin (30 µg)	6	-	2 (33,4)	4 (66,6)
Streptomycin (10 µg)	6	1 (16,6)	-	5 (83,4)
Ceftiofur (30 µg)	6	1 (16,6)	1 (16,6)	4 (66,8)
Tylosin (15 µg)	6	2 (16,6)	2 (16,6)	2 (16,6)
Penicillin G (10 U)	6	-	-	6 (100)
Enrofloxacin (5 µg)	6	2 (33,4)	1 (16,6)	3 (50)
Sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg)	6	5 (83,4)	1 (16,6)	-
Oxytetracycline (30 µg)	6	-	1 (16,6)	5 (83,4)

3.3. Ekstraktların kimyasal bileşimi:

Bitkilerden elde edilen esansiyel yağların GC-MS ile analiz edilen içeriği Çizelge 3.3'te verilmiştir. *Rosmarinus officinalis* için ana bileşenler p-simen (%44,13), linalool (%20,49) ve gama-terpinen (%16,42) idi; *Thymus vulgaris* için Timol (%42,7), Furan, tetra hidro-3-metil (%11,92) ve p-Cymene (%2,48) tespit edildi.

Çizelge 3.3. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve Kekik (*Thymus vulgaris*) uçucu yağlarının kimyasal bileşimi.

Tespit edilen bileşikler	<i>Rosmarinus officinalis</i> (%)	<i>Thymus vulgaris</i> (%)
alfa-Thujene	0,34	-
alfa-Pinene	2,81	0,19
beta-Pinene	3,59	-
Myrcene	1,78	0,16
p-Cymene	44,13	2,84
o-Cymene	-	0,4
gamma-Terpinene	16,42	1,20
Terpinen-4-ol	0,79	0,37
Carvacrol	0,12	-
Camphene	1,39	0,14
linalool	20,49	-
alfa-Terpineol	0,42	0,27
Camphre	1,73	-
Borneol	0,97	0,95
Thymol	1,77	42,7
beta-Caryophyllene	0,13	0,89
Furan, tetra hydro-3-methyl	-	11,92
Cyclohexane	-	0,12
3-Octanol	-	0,20
Carene	-	0,30
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	-	0,42
Humulene	-	0,19
2-Aminopyrimidine-1-oxide	-	0,11
Spathulenol	-	0,15
Caryophyllene	-	0,58
Isoaromadendrene epoxide	-	0,10
Cyclo propane carboxamide	-	0,10

3.4. Antibakteriyel etkinlik

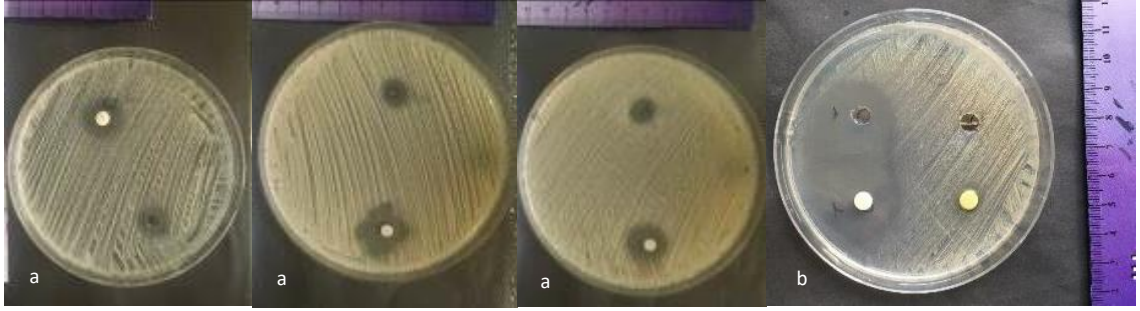
Ekstraktların ve seçilen antibiyotiklerin ortalama inhibisyon bölgesi Çizelge 3.4 ve 3.5'te gösterilmiştir. %10 DMSO (ekstrenin seyreltici) içeren negatif kontrol grubu diski, herhangi bir inhibisyona neden olmadı. Ekstraktlarda sonuçları karşılaştırmak için hem disk difüzyon hem de agar kuyucuk difüzyon yöntemleri kullanıldı. Seçilen iki bitki ekstraktı da hem MSSA hem de MRSA izolatlarına karşı etkinlik göstermiştir (Şekil 3.4 ve 3.5). MSSA izolatlarında disk difüzyon ile agar kuyucuk difüzyon yöntemi arasında inhibitör zon açısından anlamlı fark bulunurken ($p < 0,05$) MRSA grubunda bulunmadı. *Thymus vulgaris* için, MSSA ve MRSA'da her iki yöntemde de anlamlı fark yoktu.

Çizelge 3.4. MSSA ve MRSA izolatlarında *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus vulgaris*'in ortalama inhibisyon bölgesi (mm).

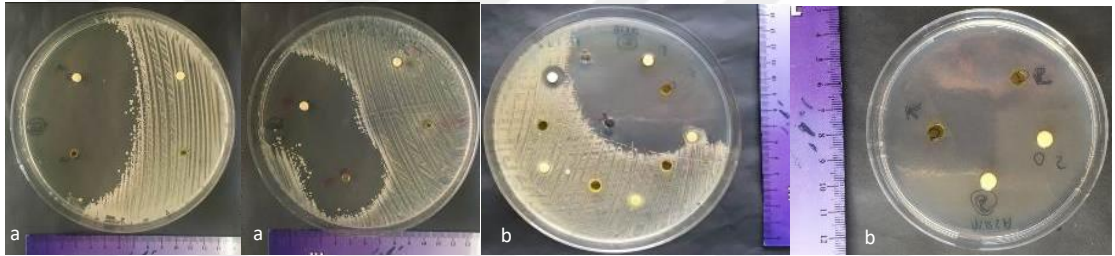
Ekstraktların inhibisyon çapları (Disk ve kuyu difüzyon yöntemi) (bölgeler mm olarak)				
Ekstraktlar	MSSA		MRSA	
	Disk difüzyon (Mean±SD)	Agar kuyucuk difüzyon (Mean±SD)	Disk difüzyon (Mean±SD)	Agar kuyucuk difüzyon (Mean±SD)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	13,9±6,1	9,9±4,2	9,1±2,1	13,5±5,8
<i>Thymus vulgaris</i>	48,4±9,6	48,2±10,4	39,3±14,5	35,8±13,3

Çizelge 3.5. MSSA ve MRSA izolatlarında antibiyotiklerin ortalama inhibisyon zonu (mm).

Antibiyotiklerin inhibisyon çapları (Disk yöntemi) (bölgeler mm olarak)		
Antibiyotikler	MSSA	MRSA
Methicillin (MET), 5 µg	22,5±4,9	NA
Cefoxitin (FOX), 30 µg	33,2±8,8	7,6±8,5
Streptomycin (S), 10 µg	25,7±3,8	4,6±7,6
Ceftiofur (FUX), 30 µg	33,3±9,1	7±11
Tylosin (TY), 15 µg	26,3±4,1	20±4,7
Penicillin G (P), 10 U	43,8±5,7	12,3±6,2
Enrofloxacin (ENR), 5 µg	35,4±5,9	20,8±11,2
Sulfamethoxazole-Trimethoprim (SXT), 25 µg	32,9±8,3	29,3±7,5
Oxytetracycline (T), 30 µg	25,4±12,6	7,8±10



Şekil 3.4. *S. aureus* izolatlarında *Rosmarinus officinalis* duyarlılığı; a) MSSA ve b) MRSA.



Şekil 3.5. *S. aureus* izolatlarında *Thymus vulgaris* duyarlılığı; a) MSSA ve b) MRSA.

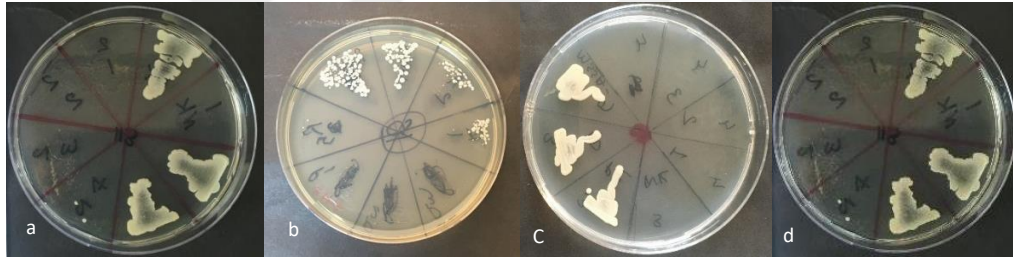
3.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK)

Şekil 3.6 ve 3.7, 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından biberiye, kekik, penisilin ve oksitetrasiklin'in seri dilüsyonu ile tedavi edilen *S. aureus* izolatları (MSSA ve MRSA) için MBK değerlerini gösteren Mueller-Hinton agar (MHA) plakalarını göstermektedir. *S. aureus*'un MSSA ve MRSA izolatlarına karşı seçilen ekstraktların ve antibiyotiklerin direnç, MİK ve MBK değerleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. MSSA izolatlarının biberiye için MİK ve MBK ortalama değerleri sırasıyla $49,3 \pm 30$ µg/mL ve $68 \pm 39,8$ µg/mL ve kekik için sırasıyla $61,5 \pm 33,2$ µg/mL ve $103,3 \pm 60$ µg/mL idi. MRSA izolatları için bu değerler biberiye için sırasıyla $85,3 \pm 30,1$ ve $213,3 \pm 60,3$ ve kekik için $170,6 \pm 60,3$ ve $213,3 \pm 60,3$ idi. MİK ve MBK değeri dirençli olmayan MSSA izolatları biberiye ve kekikte sırasıyla %40 ve %35, penisilin ve oksitetrasiklin gruplarında %10 ve

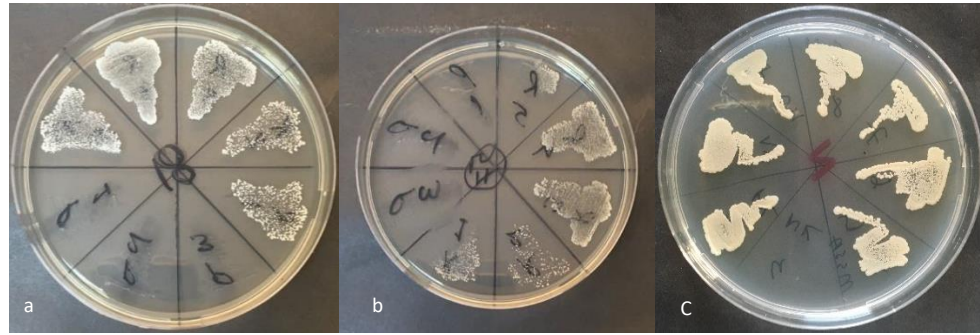
%20 idi. MRSA izolatlarının %50'si biberiye ve kekik tedavi gruplarına direnç gösterirken, bu direnç penisilin ve oksitetrasiklin grupları için sırasıyla %16,6 ve %33'tür.

Çizelge 3.6. *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus vulgaris* ile Penisilin ve Oksitetrasiklin'in MSSA ve MRSA izolatlarına karşı direnci, MİK ve MBK'si.

	MSSA (n=20)				MRSA (n=6)			
	n	R (%)	MİK (µg/mL)	MBK (µg/mL)	n	R (%)	MİK (µg/mL)	MBK (µg/mL)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	20	8 (40%)	49,3±30	68±39,8	6	3 (50%)	85,3±30,1	213,3±60,3
<i>Thymus vulgaris</i>	20	7 (35%)	61,5±33,2	103,3±60	6	3 (50%)	170,6± 60,3	213,3±60,3
Penicillin	20	2 (10%)	0,4±0,2	1,5±1,9	6	1 (16.6%)	6±2,8	39,2±25,3
Oxytetracycline	20	4 (20%)	7,7±4,4	76±59,4	6	2 (33%)	28±22,9	192±64



Şekil 3.6. a) *Rosmarinus officinalis*, b) *Thymus vulgaris*, c) Penisilin ve d) Oksitetrasiklin için MSSA büyümesinin inhibisyonunu (MBK) gösteren Mueller-Hinton agar (MHA) plakaları.



Şekil 3.7. a) *Rosmarinus officinalis*, b) *Thymus vulgaris*, c) Penisilin ve d) Oksitetrasiklin için MRSA büyümesinin inhibisyonunu gösteren Mueller-Hinton agar (MHA) plakaları.

4. TARTIŞMA

Günümüzde, çoklu ilaç direnci (Multi Drug Resistance-MDR) patojenleri son derece yaygın hale getirmekte ve hastanelerde ve ayrıca toplum düzeyinde yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bakteriler, halihazırda kullanımda olan çeşitli ilaç türlerine direnç kazanmak için geniş bir genetik potansiyele sahiptir ve kullanıma sokulan herhangi bir yeni sentetik antimikrobiyalın er ya da geç etkisiz hale geleceği iddia edilmektedir (Doyle, 2015). Son zamanlarda, DSÖ, acilen yeni ve etkili antibiyotiklere ihtiyaç duyan 12 aileye ait öncelikli bakteriyel patojenlerin bir listesini gözden geçirmiştir (Willyard, 2017). MDR organizmalarının artan prevalansı, yeni antimikrobiyal ajanlar ve bunların geliştirilmesi için acil araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir. Bitkiler, çeşitli biyoaktif maddeler (antimikrobiyaller dahil) için altın madeni niteliğinde olup dünya çapında geleneksel ilaçlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerin bazıları ucuz, güvenli ve etkili antibiyotikler geliştirmek için önemli fırsatlar sunmaktadır. Bakterilerin, bitki ekstraktlarında bulunan çoklu ve/veya kimyasal olarak karmaşık fitokimyasallara kolayca direnç geliştirme konusunda yetersiz oldukları da belirtilmelidir (Miyasaki ve ark., 2010 ve Rai ve kon, 2013). Tüketiciler, sentetik kimyasalların gıdalardaki olumsuz etkilerinden endişe duyduğundan, “temiz etiketli ürünler (clean label products)” bulma ihtiyacı üreticilerin önemli bir noktasıdır. Bu nedenle, (a) diğer muhafaza yöntemleriyle uyumlu olmaları (b) güvenli kabul edilmeleri ve (c) antioksidan, antidiyabetik, antitoksik, antitoksijenik ve antibakteriyel olarak spesifik özellikleri nedeniyle sentetik katkı maddelerine alternatif olarak doğal ekstraktların kullanılmasına artan bir ilgi vardır (Asioli ve ark., 2017). *Staphylococcus aureus*, dünya çapında stafilokokkal enterotoksinlerin (SE'ler) etkilerinden kaynaklanan gıda zehirlenmesi, gıda kaynaklı zoonotik hastalıkların dikkate değer nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Fisher ve ark., 2018). Ek olarak, bu enfeksiyonun ekonomik etkileri de hesaba katılmalıdır (Pal ve ark., 2020).

Bu çalışma, alternatif bir yol olarak iki bitki ekstraktının kimyasal bileşimini ve antibakteriyel etkilerini test etmenin yanı sıra oluşumu, antimikrobiyal aktiviteleri ve direncini araştırmıştır. *S. aureus*'un (MSSA ve MRSA izolatları) antimikrobiyal direncini tespit etmek için çiğ süt örneklerinde ekstraktların antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Böylece bu çalışmanın, süt ürünlerinde *S. aureus* kontaminasyonunun önlenmesi ve kontrol altına alınması ve son tüketicinin korunmasına yardımcı olabilecek niteliktedir.

Bu çalışmada, farklı süt merkezlerinden, subklinik mastitisli ve ilaç kullanılmayan ineklerden çiğ süt örnekleri alındı. Örneklerin %17,33'ü *S. aureus* için pozitif bulundu. Bu sonuç diğer bazı çalışmalarda SA'nın %10 ile %50 arasındaki izolasyon aralığına karşılık gelmektedir (Bartolomeoli ve ark., 2009; Jahan ve ark., 2015; Mansour ve ark., 2017 ve Rola ve ark., 2016).

Son yıllarda hayvanlarda ve insanlarda *S. aureus* ile ilişkili enfeksiyonların büyük bir halk sağlığı sorunu haline geldiği bildirilmiştir (Aires-de-Sousa, 2017; Lozano ve ark., 2016 ve Schaumburg ve ark., 2015). Çalışmada izole edilen tüm MSSA'lar sefoksitin, seftiofur, penisilin G ve enrofloksasine duyarlı olmakla birlikte oksitetrasikline yüksek direnç görülmesi durumu diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Novy, 2011). Ayrıca MRSA izolatlarının penisiline %100, oksitetrasiklin ve streptomisine %83,4 direnç göstermesi direncin oldukça yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Almanya'da yapılan bir çalışmada ruminantlar, domuz ve kanatlılardan alınan gıdalarda da metisilin direncinin oldukça yaygın olduğu belirtilmiştir (Fetsch ve ark., 2011). Oksitetrasiklin ve tilozinin Türkiye'de süt çiftliklerinde ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılması dikkat çekicidir. Ayrıca Türkiye'de *S. aureus* enfeksiyonlarında penisilin ve aminoglikozidler halen birinci basamak tedavi protokolleri olarak kullanılmaktadır. Bu tür dirençli izolatların hayvanların/insanların enfekte etmesi neredeyse kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle gıda değeri olan hayvanlarda uygun yönetim ve uygun antibiyotik reçeteleriyle antibiyotiğe dirençli *S. aureus*'un önlenmesi oldukça önem taşımaktadır (Jessen ve ark., 2017).

Onlarca yıldır MSSA ve MRSA ve bunların enterotoksinleri gıda güvenliği açısından önemli olmuştur. Bu nedenle, antibiyotik direncinin önemli ölçüde yüksek olduğu hayvan ve insanlarda olası enfeksiyon tehlikesini önlemek için çiğ gıdaların *S. aureus* ile kontaminasyonu her zaman izlenmeli ve kontrol edilmelidir (Igbinosa ve ark., 2016). Beşeri ve veteriner tıpta rutin olarak kullanılan farklı antibiyotiklere karşı artan antimikrobiyal direnç ve aynı zamanda çoklu ilaca dirençli bakteri suşlarının gelişmesiyle birlikte, bitkisel ilaçlar gibi bazı alternatif etkili tedavi yöntemlerinin araştırılması tam olarak düşünülmelidir (Dhama ve ark., 2014).

Bitkisel ürünlerin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal özellikleri birçok çalışmada araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda *Rosmarinus officinalis*'in *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkileri bildirilmiştir (Jafari-Sales ve ark., 2020a; Jafari-Sales ve ark., 2020b ve Nakagawa ve ark., 2020). Andrade ve ark. (2018), biberiye ve kekik ekstraktlarının *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Jarrar ve ark. (2010), ise *Rosmarinus officinalis*'in tek başına *S. aureus*'a karşı, sefuroksim ile kombine edildiğinde ise tüm MRSA'lara karşı etkili olabileceğini göstermiştir.

Thymus vulgaris'in antibakteriyel aktivitesi farklı çalışmalarda araştırılmıştır. *T. vulgaris*'in aktivitesi Kon ve Rai (2012) tarafından farklı uçucu yağlar ile kombinasyon halinde *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı disk difüzyon yöntemi ile taranmıştır. Başka bir çalışmada, *T. vulgaris*, birçok patojenik bakteriye karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiş ve potansiyel uygulamalar için alternatif doğal bir antibakteriyel ve antioksidan kaynağı olarak kullanılmaya özgü bir bitki olarak kendini göstermiştir (Aljabeili ve ark., 2018).

Kekik esansiyel yağının kimyasal bileşimi ve farmasötik özellikleri, araştırmacıların ve gıda endüstrilerinin büyük ilgisini çekmiştir. Bu bitkinin ilkbaharda hasat edilen uçucu yağı, *S. aureus* (MİK = 20 µg/mL), *E. coli* (MİK = 50 µg/mL) ve *S. typhimurium*'a (MİK = 500 µg/mL) karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir

(Lemos ve ark., 2017). Bir araştırmaya göre, kekik, biberiyeden daha yüksek bakterisit etkiye sahip olmaktadır. Bu sonuçlar böylece kekik ve biberiyenin gıda işlemede doğal sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir (Miladi ve ark., 2013).

Mevcut çalışmada subklinik mastitisli ineklerden alınan sütlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında iki bitkinin potansiyel antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Özellikle, MSSA'nın %90'ından fazlası metisiline duyarlıyken, tüm MRSA suşları metisiline dirençliydi. *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus vulgaris*, her iki suşta da önemli ölçüde etkili bulunmuştur. *Rosmarinus officinalis* için MİK ve MBK değerleri MSSA suşları için 49,3 µg/mL ve 68 µg/mL ve MRSA suşları için 85,3 µg/mL ve 213,3 µg/mL olarak hesaplanmıştır. *Thymus vulgaris* için bu değerler MSSA suşları için 61,5 µg/mL ve 103,3 µg/mL ve MRSA suşları için 170,6 µg/mL ve 213,3 µg/mL olarak bulunmuştur. Tespit edilen MİK ve MBK değerleri arasındaki fark ekstraktlar arasında ve suşlar arasında istatistiksel anlamda oldukça farklılık göstermiştir ($p < 0,05$).

Sıcak iklimlere sahip Akdeniz ve Orta Doğu ülkelerindeki süt sektörleri, elde ettikleri süt ve süt ürünlerinde sürekli olarak değişik kontaminasyonlar ve hayvanlarla ilgili enfeksiyon tehlikesinden şikayet etmektedirler (Claeys ve ark., 2013; Pulina ve ark., 2018 ve Verraes ve ark., 2015). Dupas ve ark. (2020), süt işlemede farklı bitkilerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini derlediği makalesinde çiğ sütün mikrobiyal kontaminasyonunu geciktirmek için bitki ekstraktlarının kullanılmasının gerektiğini ve bu türden uygulamaların özellikle sürekli kontaminasyondan şikayet eden bölgelerde uygulanmasının acil ihtiyaç olduğunun altını çizmiştir. Kozłowska ve ark. (2015), *S. aureus* suşlarının biberiye özünü duyarlı olduğunu göstermiştir. Benzer raporlar, biberiye'nin süt ürünleri üzerindeki antibakteriyel özelliklerini doğrulamaktadır (Boutoia ve ark., 2013; Ghalem ve Zouaoui, 2013 ve Paşca ve ark., 2015).

Kekik bitkisi için de *S. aureus*'a karşı etkili olduğuna dair araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin Abboud ve ark. (2015), mastitise neden olan *Staphylococcus* spp.

ve *Streptococcus* spp. suşlarına karşı kekik bitkisi ekstraktlarının önemli antibakteriyel aktivite gösterdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar kekik bitkisinin gıda diyet sistemlerinde doğal bir antibiyotik olarak kullanıma uygun bir aday olabileceğini göstermektedir.

Bitkilerin doğal antibiyotik olarak kullanılabilme potansiyeline rağmen, bu etkilerinin yapısal kompozisyonları, coğrafi konumları, yetiştirme ve hasat yöntemlerine ve ticarileştirme süreçlerine göre farklılık gösterebileceğinin de göz önünde bulundurulması gerektiğinin altı çizilmelidir. Ek olarak, ekstraksiyon yöntemleri, ekstraktlardaki aktif bileşenler, farklı bakteri suşları gibi farklı faktörler, önceki çalışmalardan farklı sonuçlara yol açabilir. Çeşitli bitkilerden elde edilen yağlar gibi doğal bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini araştırmak için standart bir yöntemin olmaması nedeniyle farklı çalışmalarda değişik sonuçların alınması durumuyla sık sık karşılaşılabilmektedir (Othman ve ark., 2018).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada Ankara'nın değişik bölgelerinde bulunan subklinik mastitisli süt ineklerinde *S. aureus*'un MSSA ve MRSA izolatlarının bulunabileceğini göstermektedir. Böylece önemli bir halk sorunu olan *S. aureus* izolatlarının prevalansını, oluşumunu ve kontrol yöntemlerini araştırmak için daha fazla araştırma yapılması gerektiği ifade edilmelidir. Halk sağlığının korunmasından sorumlu yetkili otoritelerin özellikle yetiştiriciler arasında bu konuda farkındalık oluşturmaları ve kontrol ve denetimlerin daha sık yapılması önerilmektedir.

Yapılan çalışmada sütlerden izole edilen MSSA ve MRSA suşlarına karşı in vitro ortamda *Rosmarinus officinalis* (biberiye) ve *Thymus vulgaris* (kekik)'ten elde edilen uçucu yağların iyi antibakteriyel etkinlik gösterebilecekleri tespit edilmiştir. Böylece bu bitkilerin süt sektöründe ve insanlarda kontaminasyonun önlenmesi için kullanılabileceği görülmektedir. Mevcut çalışmanın bulgusu, bu bitkilerin antibakteriyel etkilerinin in vivo çalışmaları için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir. Sonuçlara dayanarak, bu bitkilerin gıda ve ilaç endüstrilerinde özellikle stafilokok enfeksiyonlarına karşı yenilikçi terapötik alternatifler olarak değerlendirilebileceği görülmektedir.

Süt sektöründe birçok bitkinin özellikle geleneksel olarak peynir yapımında, lezzet verici özelliklerinin yanı sıra teknolojik özellikleri (örneğin sütün pıhtılaşması, ambalajlanması) için kullanıldığı bilinmektedir. Bu bitkilerden bazıları, gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal özellikler sergileyen peptitler ve/veya sekonder metabolitler içerir. Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde, başta çiğ süt olmak üzere süt ürünleri, yerel ekonomik sektörde ve yerel tüketicilerin beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, soğutma veya yeterli dönüştürme ekipmanının olmaması nedeniyle çiğ sütün patojenik suşlarla kontaminasyon seviyesi artabilir. Bu nedenle, geleneksel olarak süt ürünleriyle ilişkilendirilen bitkilerle çiğ sütün mikrobiyal kontaminasyonunu geciktirmek çözümün bir parçası olabilir. Bu tür çözümler,

düzenlemelere ve ekonomik hususlara saygı duyularak tüm Akdeniz ülkelerinde geliştirilebilir. Bununla birlikte bu türden uygulamaların sütün pıhtılaşması ve olgunlaşmasında rol oynayan teknolojik florayı korurken, patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkili oldukları bilimsel çalışmalarla kanıtlanmalıdır.



ÖZET

Mastitisli İnek sütlerinden İzole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı bazı Bitkisel Ekstraktların Etkilerinin Araştırılması

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), yüzeysel cilt enfeksiyonlarından sistemik hastalıklara kadar çok sayıda enfeksiyona neden olan dikkate değer bir patojendir. *S. aureus*'un antibiyotik direnci geliştirmesi ile hayvanlarda ve insanlarda stafilokok enfeksiyonlarında yeni, etkili ve güvenli alternatif tedavi seçeneklerinin bulunması büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada, öncelikle Ankara-Türkiye’de bulunan subklinik mastitisli ineklerden 150 çiğ süt örneği toplanmış ve *S. aureus* (MSSA ve MRSA suşları) oluşumu açısından araştırılmış, ardından ekstrakte edilen iki bitkinin (*Rosmarinus officinalis* ve *Thymus vulgaris*) kimyasal bileşimi ve antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Büyükbaş çiğ süt örneklerinde *S. aureus* oluşumu %17,33 idi. Daha sonra izolatların genel olarak kullanılan dokuz antibiyotiğe ve iki bitki özütüne karşı duyarlılıkları disk difüzyon testi kullanılarak test edildi.

Tüm MSSA izolatları sefoksitin, seftiofur, penisilin G ve enrofloksasine tamamen duyarlıydı. Ancak metisilin, streptomisin, tilosin ve sülfametoksazol-trimetoprim için direnç tespit edilmemiştir. En yüksek antibakteriyel direnç sırasıyla %40 (orta direnç) ve %15 (tam direnç) ile oksitetrasiklin için kaydedildi. MRSA izolatları metisilin ve penisiline tamamen dirençliydi. Bununla birlikte, bazı MRSA izolatları bazı antibiyotiklere duyarlıydı. Sülfametoksazol-trimetoprim %83,4 ile en etkili antibiyotikti. *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus vulgaris*'in *S. aureus* izolatlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) kullanılarak değerlendirildi. Bulgular, *R. officinalis* ve *T. vulgaris*'in MSSA ve MRSA suşu üzerinde güçlü antibakteriyel etkileri olduğunu gösterdi. Bu bitkilerin *S. aureus* izolatlarına karşı etkinliği, süt ürünlerinde ve insan sağlığında alternatif tedavi için antibakteriyel bir ajan olarak uygulanabilirliğini göstermekte ve bu alanda daha fazla araştırmayı motive etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal Duyarlılık, Çiğ Süt, *Staphylococcus aureus*, Uçucu Yağ.

SUMMARY

Investigation of the Effects of Some Herbal Extracts against *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitistic cow's milk.

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) is a remarkable pathogen that causes a multitude of infections ranging from superficial skin infections to systemic diseases. With the developing of antibiotic resistance by *S. aureus*, finding new, effective, and safe alternative therapeutic options in staphylococcal infections in animals and humans is crucially demanded. In the present study, first, the mastitistic bovine raw milk samples in Turkey were collected and explored for the occurrence of *S. aureus* (MSSA and MRSA strains) and then the chemical composition and antibacterial effects of two herbal extracted (*Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*) were evaluated on obtained isolated. A total of 150 samples were analyzed using phenotypic and microbiological approaches. The occurrences of *S. aureus* in bovine raw milk samples were 17.4%. Then, the isolates were tested for their sensitivity to nine generally used antibiotics and two herbal extracts agents by using disc diffusion assay.

All MSSA isolates were fully susceptible to cefoxitin, ceftiofur, penicillin G, and enrofloxacin. However, resistance was recorded for methicillin, streptomycin, tylosin, and sulfamethoxazole-trimethoprim. The most antibacterial resistance was recorded for oxytetracycline with 40% (intermediate resistance) and 15% (full resistance) respectively. The MRSA isolates were entirely resistant to methicillin and penicillin. Nevertheless, some MRSA isolates were susceptible to some antibiotics. Sulfamethoxazole-trimethoprim were the most effective antibiotic with 83.4%. The antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *S. aureus* isolates were evaluated using minimum inhibitory concentration (MIK) and minimum bactericidal concentration (MBK). The findings revealed that *R. officinalis* and *T. vulgaris* acted as potent antibacterial agents on MSSA and MRSA strain. The efficiency of these herbs against *S. aureus* isolates indicates their applicability as an antibacterial agent for alternative therapy in dairy products as well as human health and motivates further research in this area.

Keywords: Antimicrobial Susceptibility, Essential Oil, Raw Milk, *Staphylococcus aureus*.

KAYNAKLAR

- ABBOUD M, EL RAMMOUZ R, JAMMAL B, SLEIMAN M (2015). In vitro and in vivo antimicrobial activity of two essential oils *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* against bovine *Staphylococcus* and *Streptococcus mastitis* pathogen. *Middle East J. Agric. Res*, **4**: 975-983.
- AIRES-DE-SOUSA M (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*, **23(6)**: 373-380.
- AKARCA G, ÇAGLAR A, TOMAR O (2016). The effects of spicing on quality of mozzarella cheese. *Mljekarstvo*, **66**: 112–121.
- AKINDOLIRE M A, BABALOLA O O, ATEBA C N (2015). Detection of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* from milk: a public health implication. *International journal of environmental research and public health*, **12(9)**: 10254-10275.
- AKINYEMI K O, OLADAPO O, OKWARA C E, IBE C C, FASURE K A (2005). Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **5**:6.
- ALJABEILI H S, BARAKAT H, ABDEL-RAHMAN H A (2018). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences*, **9(05)**: 433.
- AMIRI H (2012) Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three *Thymus* Species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID: 728065.
- ANDRADE M A, RIBEIRO-SANTOS R, BONITO M C C, SARAIVA M, SANCHES-SILVA A (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Lwt*, **92**: 497-508.
- ANZAI T, KAMADA M, KANEMARU T, SUGITA S, SHIMIZU A, HIGUCHI T (1996). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from mares with metritis and its zooepidemiology. *Journal of Equine Science* **7**: 7-11.
- ARENDRUP M C, PRAKASH A, MELETIADIS J, SHARMA C, CHOWDHARY A (2017). Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **61(6)**: e00485-17.
- ASIOLI D, ASCHEMANN-WITZEL J, CAPUTO V, VECCHIO R, ANNUNZIATA A, NÆS T, VARELA P (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food

choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, **99**: 58-71.

AVŞAR C, KESKIN H, BERBER İ (2016). Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Mikroorganizmalara Karşı Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi. *Int J Pure Appl Sci*. **2(1)**: 22-29.

AYGUN O, ASLANTAS O, ONER S (2005). A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. *J. Food Eng*, **66**: 401–404.

BACIGALUPE R, TORMO-MAS M Á, PENADÉS J R, FITZGERALD J R (2019). A multihost bacterial pathogen overcomes continuous population bottlenecks to adapt to new host species. *Science advances*, **5(11)**: eaax0063.

BAG A, CHATTOPADHYAY R R (2015). Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PloS one*, **10(7)**: e0131321.

BARBER M (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of clinical pathology*, **14(4)**: 385.

BARBOSA L N, RALL V L M, FERNANDES A A H, USHIMARU P I, DA SILVA PROBST I, FERNANDES JR A (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne pathogens and disease*, **6(6)**: 725-728.

BARRETT J F (2005). MRSA—what is it, and how do we deal with the problem? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **9**: 253–265.

BARTOLOMEOLI I, MAIFRENI M, FRIGO F, URLI G, MARINO M (2009). Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk for cheese making. *International journal of dairy technology*, **62(3)**: 366-371.

BASANISI M G, LA BELLA G, NOBILI G, FRANCONIERI I, LA SALANDRA G (2017). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiology*, **62**: 141-146.

BASCH E, ULBRICHT C, HAMMERNESS P, BLEVINS A, SOLLARS D (2004). Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. *J. Herb. Pharmacother*. **4**: 49-67.

BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol*, **45**: 493.

BECKER K (2018). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus aureus* (pp. 13-38). Academic Press.

BENDER J B, TORRES S M F, GILBERT S M, OLSEN K E, LEDELL K H (2005). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a non-healing abscess in a cat. *Veterinary Record* **157**: 388–389.

- BERBER İ, AVŞAR C, ÇİNE N, BOZKURT N, ELMAS E (2013). Sinop’da yetişen bazı bitkilerin metanolik ekstraktlarının antibakteriyal ve antifungal aktivitelerinin belirlenmesi. *Karaelmas Fen Müh. Derg.*, **3(1)**: 10-6.
- BERGER B B, ROHRER S (2002). Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. *Archives of Microbiology* **178**: 165-171.
- BHAT MA, MALIK RA, PRAKASH P, LONE AM (2018). Preparation and evaluation of antibacterial potential of *Pithecellobium dulce* root extract against Gram positive and Gram negative bacteria. *Microb Pathog.* **116**: 49-53.
- BORGES R S, ORTIZ B L S, PEREIRA A C M, KEITA H, CARVALHO J C T (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, **229**: 29-45.
- BOUTOIAL K, FERRANDINI E, ROVIRA S, GARCÍA V, LÓPEZ M B (2013). Effect of feeding goats with rosemary (*Rosmarinus officinalis* spp.) by-product on milk and cheese properties. *Small Ruminant Research*, **112(1-3)**: 147-153.
- BROWN SD, TRACZEWSKI MM. (2009). In vitro antimicrobial activity of a new cephalosporin, ceftaroline, and determination of quality control ranges for MIC testing, *Antimicrob Agents Chemother* **53(3)**: 1271-4.
- CELIKTAS O Y, KOCABAS E H, BEDİR E, SUKAN F V, OZEK T, BASER K H C (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, **100(2)**: 553-559.
- CHAUVET M (2016). *Thymus vulgaris* (PROSEA), Erişim adresi: [[https://uses.plantnet-project.org/en/Thymus_vulgaris_\(PROSEA\)](https://uses.plantnet-project.org/en/Thymus_vulgaris_(PROSEA))] Erişim tarihi: 30/07/2022.
- CHEUNG S, TAI J (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*, **17(6)**: 1525-1531.
- CHRISTOPHER B (2008). RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants. Dorling Kindersley, United Kingdom.
- CHUA L Y, CHONG C H, CHUA B L, FIGIEL A (2019). Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a review. *Food and Bioprocess Technology*, **12(3)**: 450-476.
- CLAEYS W L, CARDOEN S, DAUBE G, DE BLOCK J, DEWETTINCK K, DIERICK K, De ZUTTER L, HUYGHEBAERT A, IMBERECHTS H, THIANGE P, VANDENPLAS Y (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control*, **31(1)**: 251-262.

- CLSI (2020). Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data. 5th ed. CLSI guideline M39. Hindler J A, Simner P J: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- COIA J E, DUCKWORTH G J, EDWARDS D I, FARRINGTON M, FRY C, HUMPHREYS H, MALLAGHAN C, TUCKER D R, (2006). Joint working party of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the control and prevention of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection*. **63(Suppl. 1)**: S1–S44.
- CORNARA L, LA ROCCA A, MARSILI S, MARIOTTI M G (2000). Traditional uses of plants in the eastern Riviera (Liguria, Italy). *J. Ethnopharmacol*. **125**: 16–30.
- COŞKUN M V, USLU H, UYANIK M H, HANCI H (2017). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında in vitro seftarolin etkinliğinin araştırılması. *ANKEM Derg*. **31(1)**: 14-22.
- COUTINHO H D, COSTA J G, LIMA E O, FALCÃO-SILVA V S, SIQUEIRA J P (2009). Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **9**: 13.
- DEVRIESE L A, HOMMEZ J (1975). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Research in Veterinary Science* **19**: 23-27.
- DHAMA K, TIWARI R, CHAKRABORTY S, SAMINATHAN M, KUMAR A, KARTHIK K, WANI M Y, AMARPAL S S, RAHAL A (2014). Evidence based antibacterial potentials of medicinal plants and herbs countering bacterial pathogens especially in the era of emerging drug resistance: An integrated update. *Int J pharmacol*, **10(1)**: 1-43.
- DIMA C, DIMA S (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, **5**: 29-35.
- DOYLE M E (2015). Multidrug-resistant pathogens in the food supply. *Foodborne Pathogens and Disease*, **12(4)**: 261-279.
- DUKE J A (1992). Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants; *CRC Press: Boca Raton, FL, USA*.
- DUPAS C, MÉTOYER B, EL HATMI H, ADT I, MAHGOUB S A, DUMAS E (2020). Plants: A natural solution to enhance raw milk cheese preservation?. *Food Research International*, **130**: 108883.
- EL-SAYED S M, YOUSSEF A M (2019). Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon*, **5(6)**: e01989.

- EMEKA L B, EMEKA P M, KHAN T M. (2015). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* L. seed oil against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic wounds. *Pak J Pharm Sci.* **28**: 1985-1990.
- ENRIGHT M C (2003). The evolution of a resistant pathogen—the case of MRSA. *Current Opinion in Pharmacology.* **3**: 474-479.
- ENRIGHT M C, ROBINSON D A, RANDLE G, FEIL E J, GRUNDMANN H, SPRATT B G (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99(11)**: 7687-7692.
- ESCOP (2007) ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy in Collaboration with Georg Thieme.
- ESIYOK D, OTLES S, AKCICEK E (2004). Herbs as a food source in Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **5(3)**: 334-339.
- FETSCH A, KRAUSHAAR B, KRAUSE G, GUERRA-ROMAN B, ALT K, HAMMERL J A, KASBOHRER A, BRAEUNIG J, APPEL B, TENHAGEN B A (2011). Methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* from farm to fork impact on food safety. *Scientific journal" Meat Technology"*, **52(1)**: 60-65.
- FISHER E L, OTTO M, CHEUNG G Y (2018). Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in microbiology*, **9**: 436.
- FRATIANNI F, DE MARTINO L, MELONE A, DE FEO V, COPPOLA R, NAZZARO F (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of food science*, **75(8)**: M528-M535.
- FUJIKAWA H, MOROZUMI S (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, **23(3)**: 260-267.
- GACHKAR L, YADEGARI D, REZAEI M B, TAGHIZADEH M, ASTANEH S A, RASOOLI I (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food chemistry*, **102(3)**: 898-904.
- GHALEM B R, ZOUAOUI B (2013). Microbiological, physico-chemical and sensory quality aspects of yoghurt enriched with *Rosmarinus officinalis* oil. *African Journal of Biotechnology*, **12(2)**.
- GILLET M (1998). Growing and Using Thyme; Storey Publishing: North Adams, MA, USA.
- GOLDSTEIN F W (2007). Combating resistance in a challenging, changing environment. *Clinical Microbiology and Infection* **13**: 2-6.

- GONI P, VERGARA Y, RUIZ J, ALBIZU I, VILA J, GOMEZ-LUS R (2004). Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *International Journal of Antimicrobial Agents* **23**: 268-272.
- GRACE D, FETSCH A (2018). *Staphylococcus aureus*-A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview. *Staphylococcus aureus*, 3-10.
- GUNASEKARA T, RADHIKA N, RAGUNATHAN K K, GUNATHILAKA D, WEERASEKERA M M, HEWAGEEGANA H, ARAWWAWALA LADM, FERNANDO S (2017). Determination of Antimicrobial Potential of Five Herbs used in Ayurveda Practices against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Anc Sci Life*. Apr-Jun; **36(4)**: 187-190.
- HAMMER K A, CARSON C F, RILEY T V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. **86**: 985-90.
- HANNAN A, SALEEM S, CHAUDHARY S, BARKAAT M, ARSHAD M U (2008). Antibacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. **20**: 72-74.
- HARADA D, NAKAMINAMI H, MIYAJIMA E, SUGIYAMA T, SASAI N, KITAMURA Y, TAMURA T, KAWAKUBO T, NOGUCHI N (2018). Change in genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) affects the antibiogram of hospital-acquired MRSA. *Journal of infection and chemotherapy*, **24(7)**: 563-569.
- HARTUNG T (2018). Rebooting the generally recognized as safe (GRAS) approach for food additive safety in the US. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX*, **35(1)**: 3-25.
- HEELAN J S, HASENBEIN M E, MCADAM A J (2004). Resistance of group B Streptococcus to selected antibiotics, including erythromycin and clindamycin. *Journal of clinical microbiology*, **42(3)**: 1263-1264.
- HEIDARI-VALA H, HARIRY R E, SADEGHI M R, AKHONDI M M, NOVIN M G, HEIDARI M (2013). Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) for its activity on the hormonal and cellular function of testes in adult male rat. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, **12(2)**: 445.
- HERIGSTAD B, HAMILTON M, HEERSINK J (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*, **44(2)**: 121-129.
- HONÓRIO V G, BEZERRA J, SOUZA G T, CARVALHO R J, GOMES-NETO N J, FIGUEIREDO R C, MELO J V, SOUZA E L, MAGNANI M (2015). Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. *Front Microbiol*. **3(6)**: 1223.
- HUDZICKI J (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol.

- HUSSAIN A I, ANWAR F, NIGAM P S, SARKER S D, MOORE J E, RAO J R, MAZUMDAR A (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Science and Technology*, **44**(4): 1199-1206.
- IBEZIM E C (2005). Microbial resistance to antibiotics. *Afr. J. Biotech.*, **4**(13): 1606-11.
- IGBINOSA E O, BESHIRU A, AKPOREHE L U, OGOFURE A G (2016). Detection of methicillin-resistant staphylococci isolated from food producing animals: A public health implication. *Veterinary sciences*, **3**(3): 14.
- INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **53**(12): 4961-4967.
- JAFARI-SALES A, HOSSEIN-NEZHAD P (2020a). Antimicrobial effects of Rosmarinus officinalis methanolic extract on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in laboratory conditions. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, **3**(2): 103-108.
- JAFARI-SALES A, PASHAZADEH M (2020b). Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, **3**(1): 62-69.
- JAHAN M, RAHMAN M, PARVEJ M S, CHOWDHURY S M Z H, HAQUE M E, TALUKDER M A K, AHMED S (2015). Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, **2**(1): 49-55.
- JARRAR N, ABU-HIJLEH A, ADWAN K (2010). Antibacterial activity of Rosmarinus officinalis L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **3**(2): 121-123.
- JESSEN L R, SØRENSEN T M, LILJA Z L, KRISTENSEN M, HALD T, DAMBORG P (2017). Cross-sectional survey on the use and impact of the Danish national antibiotic use guidelines for companion animal practice. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **59**(1): 1-9.
- JEVONS M P (1961). "Celbenin"-resistant staphylococci. *British medical journal*, **1**(5219): 124.
- JIANG Y, WU N, FU Y J, WANG W, LUO M, ZHAO C J, ZU Y G, LIU X L (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*, **32**(1), 63-68.

- KADLEC K, ENTORF M, PETERS T (2019). Occurrence and characteristics of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in quarter milk samples from dairy cows in Germany. *Frontiers in microbiology*, **10**: 1295.
- KARABEGOVIĆ I T, VUKOSAVLJEVIĆ P V, NOVAKOVIĆ M M, GORJANOVIĆ S Ž, DŽAMIC A M, LAZIĆ M L (2012). Influence of the storage on bioactive compounds and sensory attributes of herbal liqueur. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* **7**: 1587-1598.
- KIME L, RANDALL C P, BANDA F I, COLL F, WRIGHT J, RICHARDSON J, EMPEL J, PARKHILL J, O'NEILL A J (2019). Transient silencing of antibiotic resistance by mutation represents a significant potential source of unanticipated therapeutic failure. *MBio*, **10**(5): e01755-19.
- KIRKAN Ş, GÖKSOY E Ö, KAYA O (2005). Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29**(3): 791-796.
- KON K, RAI M (2012). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Nusantara Bioscience*, **4**(2).
- KONTOGIANNI V G, TOMIĆ G, NIKOLIĆ I, NERANTZAKI A A, SAYYAD N, STOSIC-GRUJICIC S, STOJANOVIĆ I, GEROTHANASSIS I P, TZAKOS A G (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food chemistry*, **136**(1): 120-129.
- KOZŁOWSKA M, LAUDY A E, PRZYBYŁ J, ZIARNO M, MAJEWSKA E (2015). Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Acta Pol. Pharm*, **72**(4): 757-767.
- KURLEND A, GRINHOŁC M (2012). Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochimica Polonica*, **59**(2).
- LEE J H (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 6489-6494.
- LEMOS M F, LEMOS M F, PACHECO H P, GUIMARÃES A C, FRONZA M, ENDRINGER D C, SCHERER R (2017). Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, **95**: 543-548.
- LEONARD F C, MARKEY B K (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *The Veterinary Journal*, **175**(1): 27-36.

- LOZANO C, GHARSA H, BEN SLAMA K, ZARAZAGA M, TORRES C (2016). *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. A review in the African continent. *Microorganisms*, **4**(1): 12.
- MACHADO T B, PINTO A V, PINTO M C, LEAL I C, SILVA M G, AMARAL A C, KUSTER R M, NETTO-DOSSANTOS K R (2003). In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. **21**(3): 279-84.
- MAHER ALI AHMED M, SAEED MOHAMMED A, EBTESAM HASAN A (2011) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turkish Journal of Biochemistry*, **36**: 342-349.
- MILADI H, SLAMA R B, MILI D, ZOUARI S, BAKHROUF A, AMMAR E (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens.
- MANSOUR A S, WAGIH G E S, MORGAN S D, ELHARIRI M, EL-SHABRAWY M A, ABUELNAGA A S, ELGABRY E A (2017). Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains in bovine raw milk by reversed passive latex agglutination and multiplex polymerase chain reaction. *Veterinary world*, **10**(8): 843.
- MAREGESI S M, PIETERS L, NGASSAPA O D (2008). Screening of some Tanzanian medicinal plants from bunds district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J. Ethnopharmacol.*, **119**: 58-66.
- MARINO M, BERSANI C (1999) Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. Measured Using a Bioimpedometric Method. *Journal of Food Protection*, **62**: 1017-1023.
- MARTIN K W, ERNST E (2003). Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**(2): 241-246.
- MARTINEZ-FRANCÉS V, RIOS S (2005). Lesser known herbal spirits of the Valencia and Alicante provinces (east-southern Spain). *Ind. Crops Rural Dev*. 417–426.
- MARTÍNEZ-GRACIÁ C, GONZÁLEZ-BERMÚDEZ C A, CABELLERO-VALCÁRCEL A M, SANTAELLA-PASCUAL M, FRONTELA-SASETA C (2015). Use of herbs and spices for food preservation: Advantages and limitations. *Current opinion in food science*, **6**: 38-43.
- MARTÍNEZ-GARCÍA S, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ S, CANCINO-DIAZ M E, CANCINO-DIAZ J C (2018). Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. *Apmis*, **126**(3): 177-185.

- MARZOLI F, TURCHI B, PEDONESE F, TORRACCA B, BERTELLONI F, CILIA G, CERRI D, FRATINI F (2021). Coagulase negative staphylococci from ovine bulk-tank milk: Effects of the exposure to sub-inhibitory concentrations of disinfectants for teat-dipping. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **76**: 101656.
- MATTHEW J ARDUINO, Microscopic image of *Staphylococcus aureus*, the causative agent of mastitis; magnified 10,000x. DRPH; Janice Carr/Centers for Disease Control and Prevention (CDC)(Image Number: 6486), Erişim adresi: [<https://www.britannica.com/science/mastitis#/media/1/368795/117094>], Erişim tarihi: 20/04/2022
- MIDDLETON J R, FALES W H, LUBY C D, OAKS J L, SANCHEZ S, KINYON J M, WU CC, MADDOX CW, WELSH RD, HARTMANN F (2005). Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 2916–2919.
- MIYASAKI Y, NICHOLS W S, MORGAN M A, KWAN J A, VAN BENSCHOTEN M M, KITTELL P E, HARDY W D (2010). Screening of herbal extracts against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Phytotherapy Research*, **24(8)**: 1202-1206.
- MOORE J, YOUSEF M, TSIANI E (2016). Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients*, **8(11)**: 731.
- MORGAN M (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62(6)**: 1181-1187.
- MOSTAFA A A, AL-ASKAR A A, ALMAARY K S, DAWOUD T M, SHOLKAMY E N, BAKRİ M M (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J Biol Sci*. **25(2)**: 361-366.
- NAKAGAWA S, HILLEBRAND G G, NUNEZ G (2020). *Rosmarinus officinalis* L.(rosemary) extracts containing carnosic acid and carnosol are potent quorum sensing inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence. *Antibiotics*, **9(4)**: 149.
- NALBANTBAŞ Z, GÖLCÜ A (2009). Kahramanmaraş yöresine ait şifalı bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. *KSU. J. Nat. Sci.*, **12**: 1-8.
- NIKOLIĆ B, VASILJEVIĆ B, MITIĆ-ĆULAFIĆ D, LESJAK M, VUKOVIĆ-GAČIĆ B, DUKIĆ N M, KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ J (2016). Screening of the antibacterial effect of *Juniperus sibirica* and *Juniperus sabina* essential oils in a microtitre plate-based MIC assay. *Bot. Serbica*, **40**: 43-48.
- NIETO G, ROS G, CASTILLO J (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, **5(3)**: 98.
- NOVY P, URBAN J, LEUNER O, VADLEJCH J, KOKOSKA L (2011). In vitro synergistic effects of baicalin with oxytetracycline and tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **66(6)**: 1298-1300.

- NZEAKO B C, AL-KHAROUSI Z S N, AL-MAHROOQUI Z (2006). Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. **6(1)**: 33-39.
- OKOH O O, SADIMENKO A P, AFOLAYAN A J (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food chemistry*, **120(1)**: 308-312.
- OLUWATUYI M, KAATZ G W, GIBBONS S (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, **65(24)**: 3249-3254.
- OSKAY M, SARI D (2007). Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*, **45**: 176–181.
- OTHMAN B R, KUAN C H, MOHAMMED A S, CHEAH Y K, TAN C W, NEW C Y, THUNG T Y, SAN CHANG W, LOO Y Y, NAKAGUCHI Y, RADU S (2018). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw shellfish at retail markets in Malaysia and antibacterial efficacies of black seed (*Nigella sativa*) oil against MRSA. *Food Control*, **90**: 324-331.
- PAK S I, HAN H R, SHIMIZU A (1999). Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *Korean Journal of Veterinary Medical Science*. **61**: 1013–1018.
- PAL M, KERORSA G B, MARAMI L M, KANDI V (2020). Epidemiology, pathogenicity, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review. *Am J Public Health Res*, **8(1)**: 14-21.
- PANLILIO A L, CULVER D H, GAYNES R P, BANERJEE S, HENDERSON T S, TOLSON J S, MARTONE W J, NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM (1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975–1991. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **13(10)**, 582-586.
- PARISIEN A, ALLAIN B, ZHANG J, MANDEVILLE R, LAN CQ (2008). Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol*. **104**: 1-13.
- PAȘCA C, MĂRGHITAȘ L A, DEZMIREAN D, BOBIȘ O, BONTA V, MĂRGĂOAN R, CHIRILĂ F, FIT N (2015). The assessment of the antibacterial activity of some plant extracts on normal and pathogenic microflora from milk. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, **48(1)**: 166-172.
- PEDONESE F, FRATINI F, PISTELLI L, PORTA F M, DI CICCIO P, FISCHETTI R, TURCHI B, NUVOLONI R (2017). Antimicrobial activity of four essential oils against pigmenting *Pseudomonas fluorescens* and biofilmproducing *Staphylococcus aureus* of dairy origin. *Italian Journal of Food Safety*. **6(4)**: 6939.

- PRAVOTOROVA A (2019), Vektör el çizilmiş siyah ve beyaz biberiye seti – İllüstrasyon, Erişim adresi: [https://www.istockphoto.com/tr/vekt%C3%B6r/vekt%C3%B6r-el-%C3%A7izilmi%C5%9F-siyah-ve-beyaz-biberiye-seti-gm1163580541-319553000?phrase=rosmarinus%20officinalis] Erişim tarihi: 30/07/2022
- PULINA G, MILÁN M J, LAVÍN M P, THEODORIDIS A, MORIN E, CAPOTE J, THOMAS D L, FRANCESCONI A H D, CAJA G (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, **101(8)**: 6715-6729.
- RAI M, KON K (EDS.). (2013). *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*. Academic Press.
- REINER K (2010). Catalase test protocol. *American society for microbiology*, 1-6.
- ROBINSON D A, ENRIGHT M C (2003). Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**: 3926–3934.
- ROLA J G, CZUBKOWSKA A, KORPYSA-DZIRBA W, OSEK J (2016). Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins*, **8(3)**: 62.
- SALAMCI E, KORDALI S, KOTAN R, CAKIR A, KAYA Y (2007). Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochem Syst Ecol*. **35**: 569-81.
- SANTANA G S, DIP E C, AGUIAR-ALVES F (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) cause dermonecrosis and bacteremia in rats. *Int Res J Microbiol*, **6**: 6-11.
- SCHAUMBURG F, PAULY M, ANOH E, MOSSOUN A, WIERSMA L, SCHUBERT G, FLAMMEN A, ALABI A S, MUYEMBE-TAMFUM J J, GROBUSCH M P, PETERS G (2015). *Staphylococcus aureus* complex from animals and humans in three remote African regions. *Clinical Microbiology and Infection*, **21(4)**: 345-e1.
- STEED M E, RYBAK M J. (2010). Ceftaroline: a new cephalosporin with activity against resistant Gram-positive pathogens, *Pharmacotherapy*. **30(4)**: 375-89.
- THYME IS PREGIOUS (2015). Erişim adresi: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/disrud_sama/classification.htm,] Erişim tarihi: 20/04/2022.

- TONG S Y, DAVIS J S, EICHENBERGER E, HOLLAND T L, FOWLER J R V G (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, **28**(3): 603-661.
- TSAI M L, LIN C C, LIN W C, YANG C H (2011). Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1108312632-1108312632.
- VERRAES C, VLAEMYNCK G, VAN WEYENBERG S, DE ZUTTER L, DAUBE G, SINDIC M, Uyttendaele M, HERMAN L (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, **50**: 32-44.
- VOSS A, LOEFFEN F, BAKKER J, KLAASSEN C, WULF M (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*. **11**: 1965–1966.
- WANG W, LI N, LUO M, ZU Y, EFFERTH T (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, **17**(3): 2704-2713.
- WANG X, ZHENG R, HUANG X, MAO Z, WANG N, LI H, WEN C, SHOU D (2018). Effects of alkaloids from *Sophora flavescens* on osteoblasts infected with *Staphylococcus aureus* and osteoclasts. *Phytother Res*. 1-10.
- WEESE J S, DACOSTA T, BUTTON L, GOTH K, ETHIER M, BOEHNKE K (2004). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the environment in a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **18**: 468-470.
- WEESE J S, ROUSSEAU J, TRAUB-DARGATZ J L, WILLEY B M, MCGEER A, LOW D E (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **226**: 580-583.
- WEESE J S, ROUSSEAU J, WILLEY B M, ARCHAMBAULT M, MCGEER A, LOW D E (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital; frequency, characterization and association with clinical disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **20**: 182-186
- WENDLANDT S, SHEN J, KADLEC K, WANG Y, LI B, ZHANG W J, Feßler A T, Wu C, SCHWARZ S (2015). Multidrug resistance genes in *Staphylococci* from animals that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. *Trends in microbiology*, **23**(1): 44-54.
- WILLYARD C (2017). The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature News*, **543**(7643): 15.
- WRIGHT G D (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC biology*, **8**(1): 1-6.

YANG N, XIE S, TANG N Y, CHOI M Y, WANG Y, WATT R M (2019). The Ps and Qs of alarmone synthesis in *Staphylococcus aureus*. PloS one, **14(10)**: e0213630.

ZUO G Y, WANG G C, ZHAO Y B, XU G L, HAO X Y, HAN J, ZHAO Q (2008). Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, **120**: 287-290.

