

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FISTIK VE ANANAS KABUK
EKSTRAKTLARININ
BİYOAKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

GAMZE ŞEKER

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ŞUBAT 2024

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜST EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**FISTIK VE ANANAS KABUK
EKSTRAKTLARININ
BİYOAKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

GAMZE ŞEKER

**DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ŞUBAT 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

DETERMINATION OF BIOACTIVITIES OF
PISTACHIO HULL AND
PINEAPPLE PEEL EXTRACTS

GAMZE ŞEKER

A THESIS OF DOCTORATE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

ADVISOR: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

FEBRUARY 2024

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 12/02/2024 tarih ve 2024/13 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 16/02/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Gamze ŞEKER'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Prof. Dr. Filiz VARDAR

ÜYE

: Prof. Dr. Gülgün TINAZ

ÜYE

: Doç Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

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

İMZA/MÜHÜR



Doktora çalışmamı
yıllardır fiziksel olarak ayrı kaldığım,
fakat asla onlarsız hissetmediğim
anneme, babama ve kardeşime ithaf ediyorum...

ÖZET

Bu tez çalışmasında, etanol ve su çözeltileri kullanılarak elde edilen fıstık dış pembe (PVE ve PVD) ve ananas kabuğu ekstraktlarının (ACE ve ACD) fitokimyasal içerikleri, antioksidan kapasiteleri, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas auroginosa*, *Streptococcus uberis*, *Bacillus cereus* ve *B. subtilis* suşlarına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinlikleri incelendi. Ayrıca, bu ekstraktların antiquorum sensing etkileri, bakteriyel hareket (süzülme ve yüzme) ve piyosiyanın üretimi inhibisyonu ile hücre zar potansiyeline ve sitoplazmik pH değerine etkileri araştırıldı.

PVE ve PVD ekstraktlarının sırasıyla; gallik asit (1.9 ve 1.5 mg/g) ve kuersetin (0.025 ve 0.009 mg/g) içeriği, antioksidan kapasiteleri (SC₅₀: 0.63 ve 0.56 mg/mL), antimikrobiyal (inhibisyon zon çapları: 15-20 mm ve 15-17 mm, MİK: 0.8-49 mg/mL ve 11.1-82.5 mg/mL, MBK: 1.3-99 mg/mL ve 15.7-150 mg/mL), antibiyofilm (önleme: %0-100, ortadan kaldırma: %30-74 ve %0-100) ve antiquorum sensing etkinlikleri (kalitatif: 18 ve 16 mm, kantitatif: %63 ve 55), piyosiyanın inhibisyonu (%61 ve 75) ve bakteriyel harekete etkileri (yüzme ve süzülme: %100) belirlendi.

ACE ve ACD ekstraktlarının sırasıyla; toplam fenolik (1.7 ve 1.4 mg GAE/g) ve askorbik asit (11.6 ve 11.2 mg/mL) içeriği, antioksidan kapasiteleri (SC₅₀: 27.19 ve 29.45 mg/mL), antimikrobiyal (inhibisyon zon çapları: 10-13 mm ve 7-12 mm, MİK: 36.7-111.2 mg/mL ve 24.9-151.8 mg/mL MBK: 49.8-157.3 mg/mL ve 39.6-197.3 mg/mL), antibiyofilm (önleme: %27-95) ve antiquorum sensing etkinlikleri (kalitatif: 14 ve 15 mm, kantitatif: %85 ve 69), piyosiyanın inhibisyonu (%94 ve 98) ve bakteriyel harekete etkileri (yüzme ve süzülme: %100) belirlendi. Ayrıca, ekstraktların *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerinde zar potansiyelini depolarizasyon yönünde değiştirdiği ve sitoplazmik pH değerlerini de farklı oranlarda düşürdüğü görüldü.

Bakır nanopartikül sentezinde indirgeyici ajan olarak kullanımı değerlendirilen PVE ekstraktı ile amorf yapıda nanopartikül elde edildiği ve kimyasal yöntemle sentezlenen bakır nanopartiküllere yakın antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının gıda, kozmetik veya ilaç endüstrileri için çeşitli biyoaktivitelere sahip potansiyel doğal ajan kaynakları olabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia vera* dış pembe kabuğu, *Ananas comosum* kabuğu, Fitokimyasal içerik, Antimikrobiyal, Antibiyofilm, Antiquorum sensing

ABSTRACT

In this thesis, the phytochemical contents, antioxidant capacities, and antimicrobial and antibiofilm activities of pistachio rosy hull (PVE and PVD) and pineapple peel extracts (ACE and ACD) obtained using ethanol and water solutions were investigated. The extracts were tested against *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus uberis*, *Bacillus cereus*, and *B. subtilis* strains by antimicrobial and antibiofilm activity tests. Additionally, the quorum sensing effects of these extracts, as well as their impact on bacterial motility (swimming and swarming), pyocyanin production inhibition, and effects on cell membrane potential and cytoplasmic pH were evaluated.

Gallic acid (1.9 and 1.5 mg/g) and quercetin (0.025 and 0.009 mg/g) contents, antioxidant capacities (SC50: 0.63 and 0.56 mg/mL), antimicrobial activities (inhibition zone diameters: 15-20 mm and 15-17 mm, MIC: 0.8-49 mg/mL and 11.1-82.5 mg/mL, MBC: 1.3-99 mg/mL and 15.7-150 mg/mL), antibiofilm activities (prevention: 0-100%, eradication: 30-74%, and 0-100%), quorum sensing activities (qualitative: 18 and 16 mm, quantitative: 63% and 55%), pyocyanin inhibition (61% and 75%), and effects on bacterial motility (swimming and swarming: 100%) were measured in PVE and PVD extracts.

The following parameters were also, assessed for ACE and ACD extracts: total phenolic (1.7 and 1.4 mg GAE/g) and ascorbic acid (11.6 and 11.2 mg/mL) contents, antioxidant capacities (SC50: 27.19 and 29.45 mg/mL), antimicrobial activities (inhibition zone diameters: 10-13 mm and 7-12 mm, MIC: 36.7-111.2 mg/mL and 24.9-151.8 mg/mL, MBC: 49.8-157.3 mg/mL and 39.6-197.3 mg/mL), antibiofilm activities (prevention: 27-95%), quorum sensing activities (qualitative: 14 and 15 mm, quantitative: 85% and 69%), pyocyanin inhibition (94% and 98%), and effects on bacterial motility (swimming and swarming: 100%). In addition, both extracts caused depolarization in membrane potential in strains of *S. aureus* and *E. coli* in altered range and lowered cytoplasmic pH values to varying extents.

The PVE extract, evaluated for its use as a reducing agent in copper nanoparticle synthesis, produced amorphous nanoparticles with antimicrobial effects similar to chemically synthesized copper nanoparticles. In conclusion, pistachio rosy hull and pineapple peel extracts were identified as potential natural sources with various bioactivities for the food, cosmetic, or pharmaceutical industries.

Keywords: *Pistacia vera* rosy hull, *Ananas comosum* peel, Phytochemical content, Antimicrobial, Antibiofilm, Quorum sensing

TEŞEKKÜR

Gebze Teknik Üniversitesi'nde bulunduğum süre boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yönlendirmeleri, sağladığı laboratuvar imkanları ve manevi desteği ile her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam sayın Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez izleme ve değerlendirme süreçlerindeki destekleri ile jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Filiz VARDAR, Prof. Dr. Gülgün TINAZ, Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT ve Dr. Öğr. Üye. Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Nanopartikül sentezi ile ilgili çalışmalarda desteklerinden dolayı Prof. Dr. Ercan ÖZDEMİR ve ekibine,

Floresan mikroskobu görüntülemelerindeki ve çalışma arkadaşı olarak destekleri nedeni ile Arş. Gör. Mehmet Soner TÜRKÜNER ve Arş. Gör. Ayşe YAZICI'ya, Tez çalışmamda SEM görüntülenmesindeki desteklerinden dolayı GTÜ Malzeme Mühendisliği Bölümü'nden Öğr. Gör. Ahmet Nazım'a, XRD analizlerindeki desteklerinden dolayı Tekniker Adem ŞEN'e,

Bu süreçte yaşadığım tüm sıkıntı ve sevinçlerde yanımda olarak bana aile sıcaklığını her zaman hissettiren laboratuvar arkadaşlarım Murat ÖZTÜRK, Arş. Gör. Pelin KİRAZ, Hazel ARKAN, Mert Can AYKAÇ, Gamze BAĞIŞLAMIŞ ve Arş. Gör. Ömür Gözde DEMİRTAŞ'a,

Akademik gelişimim esnasında zorlandığım anlarda kolayca ulaşabildiğim, beni dinlemekten yorulmayan Dr. Öğr. Üye. Başar SEVİNDİK'e,

Benim için yerini ifade edecek kadar özel sözcükleri bir araya getiremeyeceğimi düşündüğüm, aklıma ve kalbime arkadaşlığı, desteği ve yardımseverliği ile yerleşmiş arkadaşım Dr. Dr. Irmak ŞAH'a teşekkür ediyorum.

Hayatım ile ilgili aldığım tüm kararlarda beni doğru yönlendiren, içinde olduğum bu zorlu yolda tüm tercihlerimde beni destekleyen ve beni koşulsuz seven annem Hacer ŞEKER, babam Mustafa ŞEKER ve kardeşim Mehmet Yiğit ŞEKER'e şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bitkilerdeki biyoaktif bileşikler ve bu bileşiklerin belirlenmesi	3
2.1.1. Oksidasyon ve antioksidanlar	3
2.1.1.1. İçsel antioksidanlar	4
2.1.1.2. Dışsal antioksidanlar	5
2.2. Antimikrobiyal ajanlar	12
2.2.1. Antibiyotikler	12
2.2.2. Gıda endüstrisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar	14
2.2.3. Bitkisel kaynaklı antimikrobiyal ajanlar ve etki mekanizmaları	17
2.2.4. Antimikrobiyallerle bakteriyel büyümenin kontrolü	18
2.2.5. Antimikrobiyallerle bakteriyel hareketin kontrolü	21
2.2.6. Antimikrobiyallerle bakteri hücre duvarı ve hücre zarı bütünlüğüne etkisi	21
2.3. Antibiyofilm ajanlar	26
2.3.1. Biyofilm oluşum aşamaları	27
2.3.2. Biyofilm oluşumunu etkileyen etmenler	28
2.3.3. Biyofilm oluşturan bakteriler	28
2.3.4. Biyofilmlerin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	31
2.3.5. Biyofilmlerin kontrolünde kullanılan yaklaşımlar	32
2.3.6. Biyofilm oluşumunda yeter sayının algılaması (quorum sensing, QS) ve kontrolü	33
2.3.7. Bir QS indikatörü olarak <i>Chromobacterium violaceum</i> , viyolasein üretimi ve kontrolü	35
2.3.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve piyosiyenin	39
2.4. Tarımsal atıkların önemi	40
2.4.1. Fıstık (<i>Pistacia vera</i> L.) dış pembe kabuğu ve ekstraktlarının biyoaktiviteleri	40
2.4.2. Ananas (<i>Ananas comosus</i>) kabuğu ve ekstraktlarının biyoaktiviteleri	54
2.5. Nanopartikül sentezinde bitkisel ekstraktların indirgeyici ajan olarak kullanımı	60
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	63
3.1. Gereçler	63
3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler	63

3.1.2. Kullanılan cihazlar	64
3.1.3. Kullanılan bakteri suşları ve büyüme sıcaklıkları	66
3.1.4. Kullanılan tarımsal atıklar	66
3.2. Yöntemler	66
3.2.1. Tarımsal atıkların temini, ön hazırlığı ve muhafazası	66
3.2.2. Ekstraksiyon	67
3.2.2.1. Fıstık kabuklarından ekstrakt eldesi	67
3.2.2.2. Ananas kabuklarından ekstrakt eldesi	67
3.2.3. Ekstraktların kuru ağırlıklarının belirlenmesi	69
3.2.4. Ekstraktların fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi	69
3.2.4.1. Ekstraktların toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi	69
3.2.4.2. Ekstraktların toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi	70
3.2.4.3. Ekstraktların şeker içeriklerinin belirlenmesi	71
3.2.4.4. Ekstraktların kuersetin içeriklerinin belirlenmesi	71
3.2.4.5. Ekstraktların gallik asit içeriklerinin belirlenmesi	72
3.2.4.6. Ekstraktların asetik asit içeriklerinin belirlenmesi	72
3.2.4.7. Ekstraktlardaki fitokimyasalların biyokimyasal testler aracılığı ile belirlenmesi	72
3.2.4.7.1. Sülfürik asit yöntemi ile ekstraktlarda kinon varlığının belirlenmesi	72
3.2.4.7.2. Ekstraktlarda kumarin varlığının belirlenmesi	73
3.2.4.7.3. Ekstraktlarda saponin varlığının belirlenmesi	73
3.2.4.7.4. Ekstraktlarda tannin varlığının belirlenmesi	73
3.2.4.8. Ekstraktların antioksidan etkinliklerinin belirlenmesi	73
3.2.4.9. Ekstraktların içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi	75
3.2.5. Ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi	75
3.2.5.1. Kuyu difüzyonu yöntemi ile ekstraktların antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi	75
3.2.5.2. Ekstraktların minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının (MBK) belirlenmesi	76
3.2.5.3. Ekstraktların test bakterileri üzerinde zamana bağlı olarak büyüme eğrilerine etkilerinin belirlenmesi	77
3.2.6. Ekstraktların antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi	77
3.2.6.1. Ekstraktların biyofilm oluşumunu önleyici etkisi	78
3.2.6.2. Ekstraktların oluşan biyofilmi ortadan kaldırma etkinliklerinin belirlenmesi	79
3.2.7. Biyofilm tabakalarının floresan mikroskobu aracılığı ile incelenmesi	80
3.2.8. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin belirlenmesi	80
3.2.8.1. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif belirlenmesi	80
3.2.8.2. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif belirlenmesi	81
3.2.8.3. Ekstraktların yeter sayı algılamaya etkisinin kantitatif değerlendirilmesinde <i>C. violaceum</i> CV 026 suşunun canlılık durumunun belirlenmesi	82
3.2.9. Ekstraktların <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda piyosiyanın üretimini engelleyici etkilerinin belirlenmesi	82

3.2.9.1. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun piyosiyanın üretmesi amacıyla kültüre alınması	82
3.2.9.2. Piyosiyanın inhibisyonunun belirlenmesi	83
3.2.10. Ekstraktların bakteriyel harekete etkisinin belirlenmesi	83
3.2.10.1. Ekstraktların <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda süzülme hareketini engelleyici etkisinin belirlenmesi	83
3.2.10.2. Ekstraktların <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda yüzme hareketini engelleyici etkilerinin belirlenmesi	84
3.2.11. Ekstraktların seçili bakteriler üzerinde hücre zar potansiyeline etkilerinin belirlenmesi	84
3.2.12. Ekstraktların seçili bakteriler üzerinde sitoplazmik pH üzerine etkisinin belirlenmesi	85
3.2.13. Ekstraktlar aracılığı ile nanopartikül sentezi ve sentezlenen nanopartikülün antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi	86
3.2.14. İstatistiksel analizler	86
4. BULGULAR	87
4.1. Ekstraktların kuru ağırlıkları	87
4.2. Ekstraktların pH değerleri	87
4.3. Ekstraktların fitokimyasal içerikleri	88
4.3.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriği	88
4.3.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriği	92
4.4. Ekstraktların içerdiği fonksiyonel grupların Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmesi	94
4.4.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının FT-IR analizleri	94
4.4.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının FT-IR analizleri	96
4.5. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri	97
4.5.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri	97
4.5.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri	99
4.6. Ekstraktların antimikrobiyal etkinlikleri	101
4.6.1. Ekstraktların agar kuyu difüzyonu ile antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi	101
4.6.1.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri	101
4.6.1.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri	105
4.6.1.2.1. Ananas kabuğu ekstraktı eldesi için ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi	105
4.6.1.2.2. Ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri	107
4.6.2. Ekstraktların minimal inhibisyon ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi	111
4.6.2.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının minimal inhibisyon ve minimal bakterisidal konsantrasyonları	111
4.6.2.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının minimal inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları	112
4.6.3. Ekstraktların bakteri büyümelerine zamana bağlı etkileri	113
4.6.3.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının bakteri büyümelerine zamana bağlı etkileri	113

4.6.3.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının bakteri büyümelerine zamana bağlı etkileri	117
4.7. Ekstraktların antibiyofilm etkinlikleri	121
4.7.1. Ekstraktların biyofilm oluşumunu önleyici etkileri	121
4.7.1.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleyici etkileri	122
4.7.1.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleyici etkileri	123
4.7.2. Ekstraktların oluşan biyofilmleri ortadan kaldırma etkileri	124
4.7.2.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının oluşan biyofilmleri ortadan kaldırma etkileri	124
4.7.2.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının oluşan biyofilmleri ortadan kaldırma etkileri	126
4.8. Ekstraktların seçili bakteriler üzerinde biyofilm oluşumunu engelleyici etkilerinin floresan mikroskobu ile görüntülenmesi	125
4.8.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının biyofilm oluşumunu engelleyici etkilerinin floresan mikroskobu ile görüntülenmesi	126
4.8.2. Ananas kabuğu ekstraktının biyofilm oluşumunu önleyici etkisinin floresan mikroskobu aracılığı ile görüntülenmesi	128
4.9. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkileri	130
4.9.1. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif olarak değerlendirilmesi	130
4.9.1.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif olarak değerlendirilmesi	131
4.9.1.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif olarak değerlendirilmesi	132
4.9.2. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi	134
4.9.2.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi	134
4.9.2.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi	135
4.10. Ekstraktların piyosiyanin üretimine etkileri	137
4.10.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının piyosiyanin üretimine etkileri	137
4.10.2. Ananas ekstraktlarının piyosiyanin üretimine etkileri	138
4.11. Ekstraktların hücre hareketine etkileri	139
4.11.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının hücre hareketine etkileri	139
4.11.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının hücre hareketine etkileri	141
4.12. Ekstrakt uygulamalarının hücre zar potansiyeline etkileri	142
4.12.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının hücre zar potansiyeline etkileri	142
4.12.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının hücre zar potansiyeline etkileri	143
4.13. Ekstrakt uygulamalarının sitoplazmik pH üzerine etkileri	144

4.13.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının sitoplazmik pH üzerine etkileri	144
4.13.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının sitoplazmik pH üzerine etkileri	145
4.14. Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliği ve karakterizasyonu	148
4.14.1. Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu	148
4.14.2. Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliği	153
5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER	154
5.1. Tartışma	154
5.1.1. Ekstraktların özellikleri ve fitokimyasal içerik	154
5.1.2. Antioksidan kapasite	162
5.1.3. Antimikrobiyal etki	163
5.1.4. Antibiyofilm etki	168
5.1.5. Antiquorum sensing etki	171
5.1.6. Piyosiyenin inhibisyonu	174
5.1.7. Bakteriyel hareketlilik	175
5.1.8. Hücre zar potansiyeli ve sitoplazmik pH değerine etkileri	175
5.1.9. Nanopartikül sentezinde PVE ekstraktının kullanımı ve antimikrobiyal etkinliği	177
5.2. Sonuç ve öneriler	178
KAYNAKLAR	182
ÖZGEÇMİŞ	219
TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR	220

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Selsius derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
abs	: Absorbans
ACD	: Ananas kabuğu su ekstraktı
ACE	: Ananas kabuğu etanol ekstraktı
ADP	: Adenozin difosfat
Ag	: Gümüş
AIDS	: Acquired immune deficiency syndrome
Al	: Alüminyum
Anti-QS	: Antiquorum sensing
ArO•	: Fenolik radikal bileşik
ArOH	: Antioksidan fitokimyasal bileşik
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
BC	: <i>Bacillus cereus</i>
BS	: <i>Bacillus subtilis</i>
CFDA-SE	: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
Cu	: Bakır
ÇÜMER	: Çukurova Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı
DiBAC ₄ (3)	: Bis-(1,3-dibutylbarbituric Acid) trimethine oxonol
DiSC ₃ (5)	: 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EA	: <i>Enterobacter aerogenes</i>
EC	: <i>Escherichia coli</i>
EF	: <i>Enterococcus faecalis</i>
EPS	: Ekzopolisakkarit
ET-PT	: Elektron transferi-proton transfer
ETS	: Elektron taşıma sistemi
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FAO	: Food and Agriculture Organization
g	: Gram
G-1000	: Gentamisin 1000 µg/mL uygulaması
G-50	: Gentamisin 50 µg/mL uygulaması
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HPLC	: High performance liquid chromatography
HSL	: Homoserin lakton
IPA	: İndol-3-pürivik asite
k/s	: Katı/sıvı
KE	: Kuersetin eşdeğeri
kob	: Koloni oluşturma birimi
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani besiyeri
M	: Molar
MAE	: Mikrodalga aracılı ekstraksiyon

MBK	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
mg	: Miligram
MHA	: Mueller-Hinton agar besiyeri
MHB	: Mueller-Hinton sıvı besiyeri
MİK	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
mL	: Mililitre
N	: Normal
NA	: Nutrient agar besiyeri
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nm	: Nanometre
NP	: Nanopartikül
OD	: Optik Yoğunluk
PA	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC-ET/HAT	: Proton eşli elektron transferi/hidrojen atom transferi
Pd	: Palladyum
pH	: Hidrojen potansiyeli
PHG	: Proton hareket gücü
PI	: Propidyum iyodid
pKa	: Asidik iyonlaşma sabiti
ppm	: Milyonda bir
PVA	: Protodeoksiviyolaseinik asit
PVD	: Fıstık dış pembe kabuğu su ekstraktı
PVE	: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı
QS	: Quorum sensing
R•	: Serbest radikal
RH	: Nötral bileşik
RID	: Refraktif indeks dedektörü
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikada dönme hızı
s/s	: Sıvı/sıvı
SA	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SC50	: % 50 serbest radikal süpürme konsantrasyonu
SPLET	: Ardişık proton kaybı elektron transferi
SU	: <i>Streptococcus uberis</i>
TFC	: Toplam flavonoid içeriği
TiO ₂	: Titanyum oksit
TM	: Ticari marka
TPC	: Toplam fenolik içeriği
TPP ⁺	: Tetrafenil fosfonyum
TSB	: Triptik soya sıvı besiyeri
USDA	: United States Department of Agriculture
UV	: Ultraviyole
ZnO	: Çinko oksit
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Aromatik halkalarına bağlanmış olan karbon atomlarının sayısına göre fenolik bileşikler.	7
Şekil 2.2: Bitkilerden biyoaktif bileşik eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri.	9
Şekil 2.3: Viyolasein operonunun şematik gösterimi.	36
Şekil 2.4: Viyolasein biyosentezi.	37
Şekil 3.1: Toplam fenolik içerik belirlemek amacıyla oluşturulan gallik asit standardına ait kalibrasyon grafiği.	70
Şekil 3.2: Toplam flavonoid içerik belirlemek amacıyla oluşturulan kuersetin standardına ait kalibrasyon grafiği.	71
Şekil 3.3: SC ₅₀ değerlerini hesaplamada kullanılan gallik asit standardına ait kalibrasyon grafiği.	74
Şekil 3.4: SC ₅₀ değerlerini hesaplamada kullanılan askorbik asit standardına ait kalibrasyon grafiği.	75
Şekil 4.1: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarına ait gallik asit içeriklerini gösteren HPLC kromatogramı.	90
Şekil 4.2: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarına ait kuersetin içeriklerini gösteren HPLC kromatogramı.	90
Şekil 4.3: PVE ekstraktına ait kateşin (1), kafeik asit (2), epikateşin (3), p-kumarik asit (4) ve ellajik asit (5) içeriklerini (µg/g) ve bu içeriklerin tutulma zamanlarını (dk) gösteren HPLC kromatogramı.	91
Şekil 4.4: Ananas kabuğu etanol ekstraktına (ACE) ait gallik asit (1), kateşin (2), kateşin (3), p-kumarik asit (4) ve ferulik asit (5) içerikleri (mg/g) ve bu içeriklerin tutulma zamanlarını (dk) gösteren HPLC kromatogramı.	94
Şekil 4.5: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktına (PVE) ait FT-IR spektrası.	95
Şekil 4.6: Fıstık dış pembe kabuğu su ekstraktına (PVD) ait FT-IR spektrası.	95
Şekil 4.7: Ananas kabuğu etanol ekstraktına (ACE) ait FT-IR spektrası.	96
Şekil 4.8: Ananas su ekstraktına (ACD) ait FT-IR spektrası.	97
Şekil 4.9: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gallik asit (GA) farklı konsantrasyonlarının DPPH radikaline karşı antioksidan kapasiteleri (%).	98
Şekil 4.10: Ananas kabuğu etanol (ACE) ile su (ACD) ekstraktları ve askorbik asit (AA) ile gallik asidin (GA) farklı konsantrasyonlarının DPPH radikaline karşı antioksidan kapasiteleri.	100
Şekil 4.11: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1-1/32) ve gentamisin (G-50 ve G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm) (A: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, B: <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ve C: <i>S. aureus</i> ATCC 29213).	103

Şekil 4.12: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1-1/32) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm) (A: <i>S. uberis</i> ATCC 700407, B: <i>B. cereus</i> ATCC 11778 ve C: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633).	104
Şekil 4.13: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1-1/8) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm), (A: <i>E. coli</i> ATCC 25922, B: <i>E. aerogenes</i> ATCC 13408 ve C: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212).	108
Şekil 4.14: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1-1/8) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm), (A: <i>S. aureus</i> ATCC 25923, B: <i>S. aureus</i> ATCC 29213 ve C: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853).	109
Şekil 4.15: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1-1/8) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm), (A: <i>S. uberis</i> ATCC 700407, C: <i>B. cereus</i> ATCC 11778 ve C: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633).	110
Şekil 4.16: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (A: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, B: <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ve C: <i>S. aureus</i> ATCC 29213).	115
Şekil 4.17: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (A: <i>S. uberis</i> ATCC 700407, B: <i>B. cereus</i> ATCC 11778 ve C: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633).	116
Şekil 4.17: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (A: <i>E. coli</i> ATCC 25922, B: <i>E. aerogenes</i> ATCC 13408 ve C: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212).	118
Şekil 4.18: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (<i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853).	119
Şekil 4.19: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (<i>S. uberis</i> ATCC 700407, <i>B. cereus</i> ATCC 11778 ve <i>B. subtilis</i> ATCC 6633).	120
Şekil 4.20: Test bakterilerinin polistiren mikrotitrasyon plakalarında oluşturduğu biyofilm tabakalarının yoğunluğu (OD ₅₇₅).	121
Şekil 4.21: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının test bakterilerinin biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (%).	122
Şekil 4.22: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının test bakterilerinin biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (%).	124
Şekil 4.23: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile klor uygulamalarının test bakterileri	125

tarafından oluşan biyofilm tabakasının ortadan kaldırılmasına etkileri (%).	
Şekil 4.24: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının <i>E. coli</i> ATCC 29212 suşunun biyofilm oluşumunu engelleyici etkilerine ait floresan mikroskobu görüntüleri.	126
Şekil 4.25: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının <i>S. aureus</i> ATCC 25922 suşunun biyofilm oluşumunu önleyici etkilerine ait floresan mikroskobu görüntüleri.	127
Şekil 4.26: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının <i>E. coli</i> ATCC 29212 suşunun biyofilm oluşumunu önleyici etkilerine ait floresan mikroskobu görüntüleri.	129
Şekil 4.27: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının <i>S. aureus</i> ATCC 25922 suşunun biyofilm oluşumunu önleyici etkilerine ait floresan mikroskobu görüntüleri.	130
Şekil 4.28: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/32, s/s) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zonları.	131
Şekil 4.29: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/32, s/s) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zon çapları (mm).	132
Şekil 4.30: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/32, s/s) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zonları	133
Şekil 4.31: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/8, s/s) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zon çapları (mm).	133
Şekil 4.32: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1/8-1/512, s/s) <i>C. violaceum</i> CV026 suşunun HSL indüksiyonlu viyolasein üretimine ve suşun canlılığına (% kob inhibisyonu) birlikte etkisi.	135
Şekil 4.33: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1/8-1/512, s/s) <i>C. violaceum</i> CV026 suşunun HSL indüksiyonlu viyolasein üretimine ve suşun canlılığına (% kob inhibisyonu) birlikte etkisi.	137
Şekil 4.34: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının (1/8, s/s) <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşuna karşı piyosyanin üretimini inhibe edici etkileri (%).	138
Şekil 4.35: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının (1/8, s/s) <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşuna karşı piyosyanin üretimini inhibe edici etkileri (%).	139

Şekil 4.36: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE), su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun süzülme ve yüzme hareketine etkileri.	140
Şekil 4.37: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE), su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamaları ile <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun yüzme ve süzülme hareketlerinin inhibisyonu (%).	140
Şekil 4.38: Ananas kabuğu etanol (ACE), su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun süzülme ve yüzme hareketine etkileri.	141
Şekil 4.39: Ananas kabuğu etanol (ACE), su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamaları ile <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun yüzme ve süzülme hareketlerinin inhibisyonu (%).	142
Şekil 4.40: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının hücre zar potansiyeline etkisi.	143
Şekil 4.41: Ananas kabuğu etanol (ACE), su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının hücre zar potansiyeline etkisi.	144
Şekil 4.42: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının sitoplazmik pH üzerine etkisi.	145
Şekil 4.43: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının sitoplazmik pH üzerine etkisi.	146
Şekil 4.44: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı (PVE) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.	146
Şekil 4.45: Fıstık dış pembe kabuğu su ekstraktı (PVD) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.	147
Şekil 4.46: Ananas kabuğu etanol ekstraktı (ACE) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.	147
Şekil 4.47: Ananas kabuğu su ekstraktı (ACD) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.	147
Şekil 4.48: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile hazırlanan bakır nanopartiküllerin (PVE-NP) taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (A: 5.000x, B:10.000x, C: 20.000x, D: 50.000x) ve EDS spektrumları.	149
Şekil 4.49: PVE-NP'lere ait XRD spektrumu.	150
Şekil 4.50: Sodyum borhidrür aracılı hazırlanan bakır nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (A: 5.000x, B:10.000x, C: 20.000x, D: 50.000x) ve EDS spektrumları.	151
Şekil 4.51: CuSB-NP'lere ait XRD spektrumu.	152
Şekil 4.52: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı (PVE-NP) ve sodyum borhidrür aracılı hazırlanan (CuSB) bakır nanopartiküllerin (1000µg/mL) antimikrobiyal etkinliği (% inhibisyon).	153

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Kimyasal yapılarına ve etki mekanizmalarına göre antibiyotikler.	13
Çizelge 2.2: Kaynaklarına göre antimikrobiyal peptidler.	14
Çizelge 2.3: Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal etkili organik asitler.	16
Çizelge 2.4: Gıda endüstrisinde kullanılan bitkisel antimikrobiyal ajanlar ve kullanılan gıda ürünleri.	16
Çizelge 2.5: Bitkisel ekstraktların QS inhibisyonunda kullanımı.	38
Çizelge 2.6: <i>P. vera</i> dış kabuğu ekstraktları ile gerçekleştirilen fitokimyasal içerik belirleme çalışmaları.	43
Çizelge 2.7: <i>P. vera</i> kısımları ile gerçekleştirilen antimikrobiyal etki belirleme çalışmaları.	47
Çizelge 2.8: <i>Pistacia</i> sp. kısımları ile gerçekleştirilen antibiyofilm etki belirleme çalışmaları.	49
Çizelge 2.9: <i>Pistacia</i> sp. üyesi <i>P. terebinthus</i> kısımları ile <i>C. violaceum</i> CV026 bakterisinde viyolasein inhibisyonu.	51
Çizelge 2.10: <i>Pistacia</i> sp. üyeleri ile <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bakterisinde piyosianin inhibisyonu.	52
Çizelge 2.11: <i>Anacardiaceae</i> familyasının bazı üyelerinden elde edilen ekstraktların <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bakterisinde piyosianin inhibisyonu, viyolasein inhibisyonu ve bu ekstraktların bakteriyel hareketin inhibisyonuna etkisi.	53
Çizelge 2.12: Farklı yöntemlerle elde edilen ananas kabuğu ekstaktlarının fitokimyasal içerikleri.	55
Çizelge 2.13: Farklı yöntemlerle elde edilmiş ananas kabuğu ekstraktlarının çeşitli patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri.	58
Çizelge 2.14: Farklı yöntemlerle elde edilmiş ananas kabuğu ekstraktlarının çeşitli patojen bakterilere karşı antibiyofilm etkilerini inceleyen çalışmalar.	59
Çizelge 2.15: Ananas meyvesi ekstraktı ile <i>C. violaceum</i> CV026 bakterisinde viyolasein ve <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunda piyosianin inhibisyonu ile ilgili çalışma.	60
Çizelge 3.1: Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.	63
Çizelge 3.2: Ananas kabuğu ekstraksiyon yöntemini belirlemede gerçekleştirilen ön denemeler.	68
Çizelge 3.3: Biyofilm önleme çalışmasında tasarlanan kontrol grupları.	78
Çizelge 3.4: Biyofilm giderme çalışmasında tasarlanan kontrol grupları.	79
Çizelge 3.5: Mutant <i>C. violaceum</i> CV 026 aracılığıyla ekstraktların kantitatif quorum sensing inhibisyonu etkisini belirlemek için oluşturulmuş deneysel plan.	82
Çizelge 4.1: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının kuru madde miktarları.	87
Çizelge 4.2: Ekstraktların pH değerleri.	88

Çizelge 4.3: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE/g), toplam flavonoid (mg KE/g), gallik asit (mg/g ekstrakt) ve kuersetin (mg/g ekstrakt) ve toplam şeker (mg/g ekstrakt) miktarları.	89
Çizelge 4.4: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarında bulunan diğer bazı fitokimyasal bileşikler.	91
Çizelge 4.5: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE/g), gallik asit (mg/g ekstrakt), kuersetin (mg/g ekstrakt), askorbik asit (mg/g ekstrakt) ve toplam şeker (mg/g ekstrakt) miktarları.	92
Çizelge 4.6: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarında bulunan diğer fitokimyasal bileşikler.	92
Çizelge 4.7: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının DPPH süpürme etkisi (SC ₅₀) (mg/mL).	98
Çizelge 4.8: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının DPPH süpürme etkisi. (SC ₅₀) (mg/mL).	99
Çizelge 4.9: Ananas kabuğu etanol ekstraktlarının (ACE-1, ACE-2, ACE-3, ACE-4) farklı konsantrasyonlarının (1-1/8) test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm).	106
Çizelge 4.10: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerine karşı belirlenen minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal (MBK) konsantrasyonları (mg/mL).	112
Çizelge 4.11: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerine karşı belirlenen minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal (MBK) konsantrasyonları (mg/mL).	113
Çizelge 4.12: PVE-NP'lerin elementel kompozisyonu.	150
Çizelge 4.13: CuSB-NP'lerin elementel kompozisyonu.	152
Çizelge 5.1: Fıstık dış pembe kabuğu fitokimyasal içerik listesi.	158
Çizelge 5.2: Ananas kabuğu fitokimyasal içerik listesi.	160
Çizelge 5.3: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının FT-IR spektralleri sonuçlarının karşılaştırması.	161
Çizelge 5.4: Ananas kabuğu ekstraktlarının FT-IR spektralleri sonuçlarının karşılaştırması.	162
Çizelge 5.5: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktları (PVE ve PVD) ile elde edilen en yüksek ve en düşük antimikrobiyal etki sonuçları	166
Çizelge 5.6: Ananas kabuğu ekstraktları ile elde edilen en yüksek ve en düşük antimikrobiyal etki sonuçları	167
Çizelge 5.7: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının en yüksek ve en düşük antibiyofilik etkileri (%)	170
Çizelge 5.8: Ananas kabuğu ekstraktlarının antibiyofilik etkileri (%)	170
Çizelge 5.9: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının kalitatif (mm) ve kantitatif (%) anti-QS etkileri.	173
Çizelge 5.12: Ananas kabuğu ekstraktlarının kalitatif (mm) ve kantitatif (%) anti-QS etkileri.	174

1. GİRİŞ

Alternatif doğal ajanların mevcut biyokontrol ajanlarına göre biyoaktivitelerinin belirlenmesi büyük bir öneme sahiptir. Doğal ürünlere olan artan talep, mevcut koruyucu ajanların yetersiz etkinliği ve sentetik olanlarla ilişkilendirilen çevresel ve kullanıcı riskleri ile birleşince, bitki ekstraktlarının biyoaktivitelerini araştırmaya yönelik ilgi gittikçe artmıştır. Özellikle bu ekstraktların eldesinde tarımsal atıkların kullanılmasıyla elde edilen ürünün kıymeti artmaktadır.

Tarımsal uygulamalar sonucu açığa çıkan meyve ve sebze kabukları tarımsal atık olarak değerlendirilmektedir. Bu atıklar genellikle gübre veya hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, endüstriyel üretimde gıda işleme sanayi ile çok büyük miktarda atık açığa çıkmaktadır. Bu atıklar doğrudan çevreye atıldığında çevre kirliliğine yol açmaktadır. Bu yüzden bu atıkların değerlendirilmesi hem ekonomi hem de çevre kirliliğinin önlenmesi açısından önemlidir. Atık olarak değerlendirilebilecek farklı bitki kısımları çeşitli biyoaktivitelere sahip fenolikler, organik asitler ve flavonoidler gibi bazı fitokimyasallar içerirler [Aref et al., 2010]. Bu nedenle, bu atıkların değerlendirilmesi sayesinde biyoaktiviteleri olan çeşitli fenolik bileşikler, beslenmeye katkı sağlayacak protein hidrolizatları (aminoasitler), karbonhidratlar veya yağlar geri kazanılabilmektedir. Tarımsal atıklarının geri dönüşümü sonucu faydalı ürünlerin eldesi özellikle sürdürülebilir ürünler üretmeyi amaçlayan ülkeler için oldukça önemlidir [Seguí Gil and Fito Maupoey, 2018]. Bu doğrultuda, bitkisel atıkların ekstraktlarından elde edilecek katma değerli ürünlerin farklı amaçlarla kullanım potansiyellerini belirlemek ülkemiz biyoekonomisine faydalı olacaktır. Ayrıca bu ekstraktların farklı pigmentler içermesi de gıda endüstrisi gibi farklı endüstriyel alanlarda doğal boyar madde olarak kullanımlarını sağlayabilir. Ekstraktlar veya ekstraktların indirgeyici özellikleri sayesinde elde edilen nanopartiküller de halen kullanılan kimyasal ajanlara alternatif doğal antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan etkili gıda veya kozmetik katkı maddesi olarak kullanılabilmek potansiyeline sahiptir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Ülkemiz tarımsal üretim veya tarımsal ürünlerin işlenmesi esnasında çokça tarımsal atık çıkaran geniş bir gıda endüstrisi ağına sahiptir. Coğrafyamızın elverişli olması nedeniyle anavatanı Türkiye olmadığı halde topraklarımızda çok farklı gıda ürünleri kaliteli bir seviyede yetiştirilebilmektedir. Bu nedenle Türkiye büyük çeşitlilikte tarımsal atık oluşturan bir ülkedir. Endüstriyel işleme esnasında her ne kadar atık olarak değerlendirilip etkili olmayan şekillerde bertaraf edilmeye çalışılsa da meyve kabukları oldukça kıymetli bileşikleri yüksek miktarda ve çeşitlilikte içermektedir. Yapay ekosistemler olan tarımsal alanlarda ürün yetiştirmenin doğaya yükü göz önüne alındığında, topraktan kendimiz için aldığımız her ürünü olabilecek en etkin seviyede kullanmak mecburiyeti doğmuştur. Bu nedenle bir materyale “çöp” gözü ile bakmadan önce içeriğini ve kullanım potansiyelini ayrıntılı bir şekilde araştırmak gerekmektedir.

Bu amaçla bu tez çalışmasında, ülkemizde tarımı yapılan ve dünyadaki önemli üreticilerinden olduğumuz fıstık (*Pistacia vera* L.) ve özellikle meyve suyu endüstrisinde çokça kullanılan ülkemizde de işlenen ananas (*Ananas comosus* L.) meyvelerinin kabukları biyoaktif bitkisel ekstraktlar elde etmede hammaddeler olarak kullanılmıştır. Ekstraktlar, mikrodalga aracılı ekstraksiyon yöntemi ile organik çözücüler (etanol ve su) yardımı ile elde edilmiştir. Ekstraktların fitokimyasal içeriği, antioksidan, antimikrobiyal, antibiyofilm ve antiquorum sensing etkinlikleri ile bakteriyel harekete, hücre zar potansiyeline ve sitoplazmik pH değerine etkileri değerlendirilmiştir. Genel anlamda ekstraktların içerdiği biyoaktif bileşikler ile biyoaktiviteleri antimikrobiyal açıdan incelenip ilişkilendirilmiştir. Ardından etanol ekstraktının indirgeyici etkisinden faydalanılarak yeşil sentez yöntemi ile bakır oksit nanopartikülü sentezlenmiş ve elde edilen nanopartikülün karakterizasyon testleri ile antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, elde edilen veriler, başta gıda olmak üzere kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanılan mevcut sentetik antimikrobiyal kontrol ajanlarına alternatif, tarımsal atık değerlendirmesine katkı sağlayan ekstraktların etkinliklerinin değerlendirilmesine ve böylece biyoyumlu, sürdürülebilir ve bioekonomik anlamda çok değerli antioksidan, antimikrobiyal, antibiyofilm etkili katma değerli ürünlerin üretimine yeni ve ilgi çekici katkılar sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkilerdeki biyoaktif bileşikler ve bu bileşiklerin belirlenmesi

Bitkiler sekonder metabolizmaları gereğince fenolik, terpenoid, alkaloidler gibi çeşitli metabolitler üretir. Çeşitli biyoaktiviteleri olduğu bilinen bu sekonder metabolitlerin kullanım potansiyellerini belirlemek oldukça önemlidir. Bunlardan fenolik asitler ve flavonoidlerin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve fotoprotektif gibi önemli biyoaktiviteleri bulunmaktadır.

Bitki bazlı doğal antimikrobiyal bileşiklerin, özellikle gıda endüstrisinde kullanılan sentetik koruyucuların ve biyosidlerin yerini alabilirlikleri ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır [Aliyari et al., 2020; Coban, 2020]. Antimikrobiyal etkinliklerinin yanında antioksidan özellikleri de bulunan bitki fenolikleri bu açıdan oldukça dikkat çekmektedir [Novais et al., 2022; Ben Akacha et al., 2023].

Nitritler, sülfidler, polihegzametilen biguanidin (PHMB) ve triklosan gibi sentetik gıda koruyuculara veya klor gibi çok kullanılan dezenfektanlara alternatif doğal koruyucu ve dezenfektan arayışı oldukça yoğundur [Müller and Kramer, 2008; EFSA panel, 2016; Mortensen et al., 2017; Abbott et al., 2020]. Düzenlemelerinin değişmesi, tüketicilerin bilinçlenerek organik ürün talebinde olması, özellikle “temiz” etiketli ürünlere yönelimin artması doğal koruyuculara olan ihtiyacı belirlemektedir. “Temiz” konseptine uygun çok sayıda gıda koruyucunun bulunmaması bitki ekstraktlarının bu amaçla kullanım potansiyelini öne çıkarmaktadır. Bitki özütlerinin gıda endüstrisinde kullanımında amaç; organoleptik ve besinsel özelliklerini bozmadan çiğ veya az işlenmiş gıdayı korumak ve raf ömrünü arttırarak gıda israfının önüne geçmektir. Ayrıca bu ekstraktların kullanılan antibiyotikler yerine yem, kozmetik ve ilaç sektörlerine yönelik alternatif doğal katkı maddeleri olma potansiyelleri de bulunmaktadır.

2.1.1. Oksidasyon ve antioksidanlar

Canlılığını sürdürebilmek amacıyla birçok canlı oksijene ihtiyaç duymaktadır. Memelilerde plazmaya alınan oksijenin %80-90'ı kadarı mitokondri tarafından ATP üretiminde kullanıldığı tahmin edilmektedir [Willcox et al., 2004]. Metabolik enerji

üretimi için besinlerin oksidasyona uğraması gerekmektedir. Bu süreçte indirgenen bileşikler mitokondride oksijen tarafından tekrar okside edilir ve ATP oluşur [Willcox et al., 2004]. Elektron taşıma sistemindeki son enzim olan sitokrom oksidaz, oksijene elektronlar ekler ve kısmi indirgenmiş oksijen türleri üretilmiş olur [Willcox et al., 2004]. Bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron barındıran bileşiklere serbest radikaller denir [Willcox et al., 2004]. Serbest radikallerin kaynakları olarak hücrel metabolizma, elektron taşıma sisteminin aktivitesi, yaralanma, inflamatuvar yanıt, sigara içme, hava kirliliği, iyonizasyon, radyasyon ve iskemi örnek verilebilir. Eşlenmemiş elektronların varlığı serbest radikalleri okdukça reaktif bir hale getirir, çünkü orbitali doldurmak ve stabil hale geçmek için başka elektrona ihtiyaç duyarlar [Willcox et al., 2004].

Temel düzeydeki oksijene bir elektron eklendiğinde süperoksit radikali oluşur. Bu oksidasyon, demir veya bakır gibi metal iyonlarının varlığında katalizlenir. Süperoksit radikallerinin en önemli kaynağı canlılardaki elektron taşıma sistemidir (ETS). ETS birçok bakteriyel zarda, mitokondride, endoplazmik retikulumda ve ökaryotların çekirdek zarında bulunur. Bu radikaller son sitokrom oksidaz aşamasından önce oksijendeki elektronların eksik transferi ile oluşur ve onların üretimleri oksijen konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Bir çalışmada, mitokondride indirgenen oksijen türlerinin %1-3 oranında süperoksit oluşturduğu belirtilmiştir [Turrens, 1997]. Metabolizma sonucu veya stres kaynağı aktiviteler nedeni ile oluşan radikal bileşiklerin olumsuz etkilerini azaltmak için antioksidan bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Canlılar, içsel olarak kendi ürettikleri veya dışarıdan beslenme ile aldıkları bazı antioksidan özellikli sistemleri bünyelerinde bulundurmaktadır.

2.1.1.1. İçsel antioksidanlar

Katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi bazı antioksidatif enzimler süperoksitleri ve peroksitleri, onlar metallerle etkileşime girip daha reaktif olmadan hücrede bertaraf ederler. Bazı antioksidan enzimler hücrede farklı yerlerde ve farklı formlarda bulunabilir. Glutatyon peroksidaz sitosolik ve plazma formunda iken, süperoksit dismutaz membran, sitosolik ve ekstraselüler formda bulunabilir.

2.1.1.2. Dışsal antioksidanlar

Beslenme antioksidan savunma sisteminin gelişmesi açısından önemli bir rol oynar. Beslenme ile E vitaminini, C vitaminini, bazı enzimleri, beta karoten, flavonoidler ve diğer fenolikler gibi antioksidan etkinlikleri yüksek bileşikler canlı sisteme almak mümkündür. Bu bileşiklerce zengin besinleri beslenme planında tutmak, serbest radikallerin sebep olacağı hastalıkları önlemede veya etkilerini azaltmada önerilmektedir.

Bitki kaynaklı fenolik bileşikler insan beslenmesinde ve gıda korumada antioksidan özellikte olmaları nedeniyle önemli bir yere sahiptir [Rajaei et al., 2010]. Doğal antioksidanlarca zengin bitki ve bitki içeriklerinin oksidatif strese karşı güçlü koruyuculuğu olduğu bilinmektedir [Faure et al., 2013; Javan and Javan, 2014; Keser, 2014]. Son yıllarda sentetik antioksidanların toksikolojik ve karsinojenik etkileri nedeniyle doğal antioksidanların sentetik olanların yerine kullanım potansiyelini değerlendirmeye yönelik çalışmalar artmıştır [Arjeh et al., 2020].

Fenolik bileşikler pentoz fosfat, şikimat ve fenilpropanoid yollarının ürünü olan ve bitkilerde üreme, patojen ve tüketicilerine karşı koruma sağlayan sekonder metabolitlerdir [Bravo, 1998]. Aynı zamanda fenolikler, doğal antioksidan ajanlar eldesinde kullanılabilecek bileşik türlerini bolca içermektedir. Meyve ve sebzelerin renk, tat ve aroma gibi duysal özelliklerine katkı sağlayan fenolik bileşiklerin [Alasalvar et al., 2001] antiarterojenik, antiarterojenik, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, kardiyoprotektif ve vazodilatör etkiye [Benavente-García et al., 1997; Manach et al., 2005] sahip olduğu birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Bilinen bu biyoaktivitelerin meyve ve sebzelerin içerdiği fenolik bileşiklerin antioksidan etkinlikleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir [Heim et al., 2002].

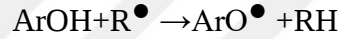
Yapıları incelendiğinde fenolik bileşikler bir aromatik halka ve bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içermektedir. Ayrıca polimerizasyon seviyeleri ile doğru orantılı olarak farklı seviyede kompleks yapıya sahip olabilirler bu özellikleri nedeni ile polifenoller olarak da adlandırılmaktadırlar [Bravo, 1998]. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkinlikleri, reaktif radikallerin inaktivasyonunu sağlayabilmeleri ile ilişkilidir. Antioksidan bileşiğin kendi elektronunu veya hidrojenini radikal bileşiğe transfer etmesi ile nötralizasyon gerçekleşir. Serbest radikallerin fenolik bileşiklerce

süpürülmesi, aşağıdaki kimyasal yolların birbirini izlemesiyle gerçekleştiği belirtilmiştir [Dawidowicz and Olszowy, 2012; Marković et al., 2013]:

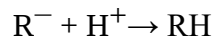
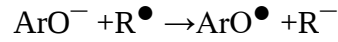
- Proton Eşli Elektron Transferi/Hidrojen Atom Transferi (PC-ET/HAT),
- Elektron Transferi-Proton Transferi (ET-PT),
- Ardışık Proton Kaybı Elektron Transferi (SPLET).

Bu reaksiyonlar arası denge, reaksiyon ortamının özelliklerine bağlı olarak değişmektedir.

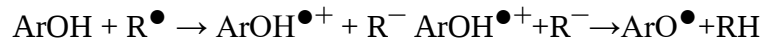
PC-ET/HAT: Bu mekanizma hidrojen atomunun hızlıca radikale verilmesi ile gerçekleşir (ArOH: antioksidan fitokimyasal bileşik, R[•]: serbest radikal, ArO[•]: fenolik radikal bileşik, RH: nötral bileşik).



SPLET: Bu mekanizmada önce antioksidan ayrışır, ardından aroksil anyonu (ArO⁻) oluşur. Daha sonra antioksidan anyondan elektron süpürülen radikale transfer olur, sonuçta radikal anyon oluşur (R⁻). Bu radikal anyon en son aşamada protonlanır.



ET-PT: Bu mekanizmada elektron radikale antioksidandan transfer olur. Oluşan antioksidan kation radikali (ArOH^{•+}) deprotone olur ve hidrojen kasyonu radikal anyona transfer olur (R⁻).

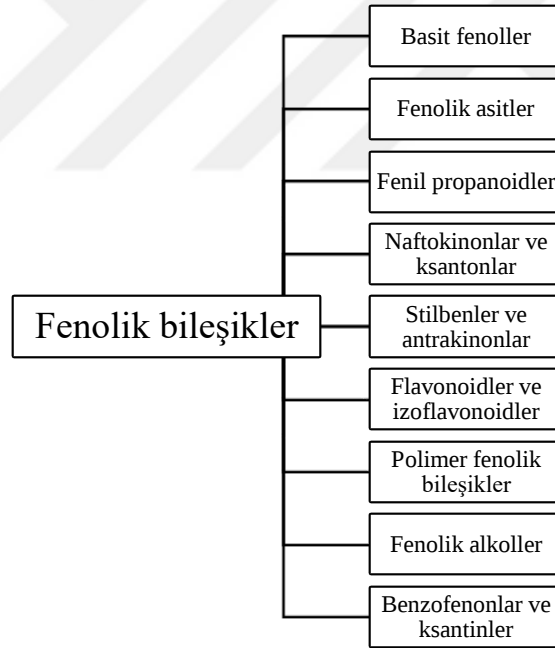


Bu bahsedilen mekanizmalarda izlenen yol farklı olsa da sonuç hep aynıdır. Fenolik antioksidanlar ve radikal arası reaksiyon genellikle PC-ET ve SPLET mekanizmaları ile gerçekleşir. PC-ET daha yavaştır, SPLET ise daha hızlıdır [Friaa and Brault, 2006].

- Fenolik bileşikler

Bitkiler fenolik, terpenoid, alkaloidler gibi çeşitli etkin biyoaktif metabolitlerin kaynaklarıdır. Bu bileşiklerin en yüksek seviyede elde edilebilmesi için çeşitli çözücüler kullanılarak ekstraksiyon işlemi uygulanmalıdır.

Bu doğrultuda, biyoaktif bileşiklerce zengin ekstraktlar elde etmek hedeflendiğinde ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin ve yöntemin flavonoidlerin de içinde bulunduğu fenolik bileşikleri açığa çıkarak şekilde seçilmesi başarıyı arttırabilir. Önceki bölümlerde de belirtildiği üzere geniş spektrumda biyoaktiviteye sahip 8000'den fazla fitokimyasal mevcuttur [Mammadov, 2014]. Aromatik halkalarının sayısına bağlı olarak fenolik bileşikler, bir aromatik halkalı fenolikler, iki aromatik halkalı fenolikler ve polimer fenolikler olmak üzere üç ana grup altında toplanmaktadır [Mammadov, 2014]. Ayrıntılı olarak ise aromatik halkaya bağlanmış olan karbon atomlarının sayısına göre dokuz gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1).

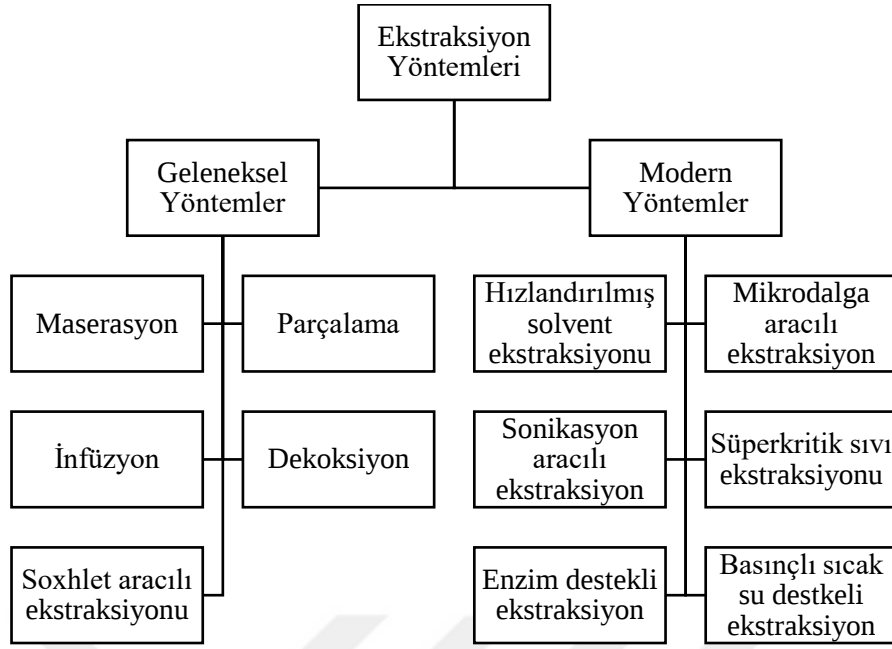


Şekil 2.1: Aromatik halkalarına bağlanmış olan karbon atomlarının sayısına göre fenolik bileşikler [Mammadov, 2014].

Ekstraksiyonda kullanılacak organik çözücünün türü ve konsantrasyonu önemlidir. Bitkisel materyalin yapısı ve elde edilmesi hedeflenen fitokimyasal bileşiğin yapısına göre optimize edilerek seçilecek bir organik çözücü, etkili konsantrasyonda kullanıldığında yüksek verimde biyoaktif bileşik içerecek şekilde ekstrakte edilebilir.

Bu amaçla genellikle temini kolay olan metanol, etanol, aseton ve bunların sulu çözeltileri ile ekstraksiyon çözeltileri kullanılmaktadır. Daha kompleks ekstraksiyon işlemleri gerektiğinde ise bu çözeltiler içerisine düşük konsantrasyonlarda asit eklenmesi ile ekstraksiyon prosesi güçlendirilir, bitkisel dokulardan fenolik bileşiklerin eldesi kolaylaşır.

Fenolik bileşiklerin bitkisel kaynaklardan eldesi için birçok yöntem mevcuttur. Ekstraksiyon doğal içerikli ürünlerin eldesi ile ilgili çalışmalarda ve uygulamalarda anahtar bir prosestir. Teknolojinin ilerlemesi ile geleneksel yöntemler ekstraksiyonda başarıyı arttıracak modern yöntemlere evrilmiştir. Geleneksel yöntemler arasında maserasyon, parçalama, infüzyon, dekoksasyon ve Soxhlet aracılı ekstraksiyon bulunmaktadır [Bitwell et al., 2023]. Kontrollü şekilde ısı, basınç veya ses dalgası gibi fiziksel kuvvetleri uygulamayı sağlayarak veya enzimler aracılığı ile bitkisel dokularda tutulu olan fenolik bileşikleri yüksek yoğunlukta açığa çıkarmak için modern ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir [Bitwell et al., 2023]. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, sonikasyon aracılı ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, basınçlı sıcak su destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve mikrodalga aracılı ekstraksiyon (MAE) modern yöntemler olarak gruplanmaktadır (Şekil 2.2) [Bitwell et al., 2023]. Ekstraksiyonda verimi arttıracak, bu esnada ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin yapısını bozmayacak yöntemi belirlemek oldukça önemlidir. Bunun yanında uygulama kolaylığı ve düşük enerji sarfıyatı gibi özellikler de göz önünde bulundurulması gereken bir parametredir. Bu tez çalışmasında da modern yöntemlerden olan MAE yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 2.2: Bitkilerden biyoaktif bileşik eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri [Bitwell et al., 2023].

Fenolik bileşiklere ilgi 1990’larda artan bazı kronik hastalıklarla birlikte artmaya başlamıştır. Fenolik bileşikler bitkisel kaynakların antioksidan etkisinin temel kaynağıdır. Zaman içinde değişen beslenme alışkanlıkları nedeni ile fenolik bileşikler açısından yiyeceklerin zengin olması önemli bir kalite kriteri haline gelmiştir. Bitkisel ürünlerin içerdiği fenolik madde miktarını belirlemede Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi klasik ve etkili bir yöntem olarak kabul görmektedir. Kolorimetrik bir yöntem olan FC, Folin-Ciocalteu belirteci ve test edilen örneğin içerisindeki fenolik bileşikler arası elektron transferine dayalıdır. Bir dezavantajı, bitkisel materyal içerisinde bulunan indirgenebilir şeker veya askorbik asit gibi bazı bileşikler ile de tepkimeye girebilmesidir. Bu durum toplam fenolik madde miktarı ile bir girişime neden olacaktır [Everette et al., 2010; Huang et al., 2005]. Bunu önlemek adına metodu istenen bileşiğe göre özelleştirmek gerekmektedir. Bu amaçla:

- Teste başlamadan fenolik ekstraktın katı faz ekstraksiyon kolonu ile saflaştırılması [Georgé et al., 2005],
- Toplam sonuçtan askorbik asit konsantrasyonunun çıkarılması [Isabelle et al., 2010] ve

- Fenolik ekstraktların H_2O_2 gibi bir oksidatif ajan ile muamele edilmesi ve girişime sebep olacak bileşiklerin oksitlenmesi [Ford et al., 2010] gibi uygulamalar yapılabilmektedir.

Folin-Ciocalteu [Folin and Ciocalteu, 1927] analizi aslında Folin-Denis [Folin and Denis, 1912] analizinin geliştirilmesi ile oluşturulmuştur. Bu yöntemde, molibdat oranını değiştirerek Folin-Denis analizi esnasında oluşan beyaz çökeltiyi yok etmek amaçlanmıştır. Sonuçta elde edilen yöntem daha hassas ve tekrarlanabilir olmuştur [Singleton and Rossi, 1965]. Folin-Ciocalteu belirteci fosfotungstik ve fosfomolibdik asit karışımından elde edilmiş bir belirteçtir. Fenolik protonlar ayrışır ve fenolat iyonlar oluşur, bu da Folin-Ciocalteu belirtecini indirger [Ainsworth and Gillespie, 2007; Everette et al., 2010]. Sodyum karbonat eklenmesi ile alkalileştirilen ortamda (yaklaşık pH 10.0) gerçekleşen tepkime sonucu açığa çıkan oksotungstat ve oksomolibdat, fenolik bileşik madde miktarı ile doğru orantılı mavi renklenme gösterir [Lamuela-Raventós, 2017]. Bu rengin 760 nm dalga boyunda absorbansı okunabilir. Referans bir fenolik bileşik kullanılarak (bu çalışmada gallik asit kullanılmıştır) oluşturulacak standart çözeltilerinden alınacak absorbans değerleri ile bir kalibrasyon grafiği çizilir. Elde edilen denklemden faydalanılarak miktar tayini referans fenolik bileşik eş değeri olarak belirlenmiş olur. Folin-Ciocalteu belirteci içindeki bileşenlerden en kolay indirgenen bileşenin molibdat olduğu bilindiğinden elektron transferinin çoğunlukla indirgenenler ve molibdat arasında geçtiği düşünülmektedir [Singleton and Orthofer, 1999; Huang et al., 2005].

Flavonoidler ise, fenolik bileşikler grubuna dahil olan bir sekonder metabolit türüdür. Bitkilerde bulunan toplam fenolik madde miktarı bitkisel materyal uygun bir organik çözücü ile ekstrakte edildikten sonra kolorimetrik olarak belirlenir. Bu yöntem ilk olarak Christ and Müller (1960) tarafından ortaya konulmuş ve zaman içerisinde birçok kez güncellenmiştir. Kullanılan en yaygın yöntem alüminyum klorür yöntemidir [Shraim et al., 2021]. Bu yöntemde Al (III), reaksiyonda kompleks oluşturucu ajan olarak görev alır [Shraim et al., 2021]. Flavonoidler içerdikleri okso- ve hidroksi- grupları nedeni ile Al (III) gibi metallere bağlanma eğilimi gösterir [Pyrzynska and Pekal, 2011; Kasprzak et al., 2015]. Asit veya asetat varlığında örnek üzerine $AlCl_3$ çözeltisi (%2-10 (k/s)) eklenmesi ile tepkime gerçekleştirilir, ek olarak bazen metanol veya su eklenir [Shraim et al., 2021]. Tepkime gerçekleştikten sonra flavonoid varlığı durumunda sarı renk oluşumu gözlenir ve absorbans 404-430 nm

aralığında bir değerde ölçülür [Shraim et al., 2021]. Referans bir flavonoid kullanılarak (bu çalışmada kuersetin kullanılmıştır) oluşturulacak standart çözeltilerinden alınacak absorbans değerleri ile bir kalibrasyon grafiği çizilir. Elde edilen denklemden faydalanılarak miktar tayini referans flavonoid eş değeri olarak belirlenmiş olur.

Kromatografi bir örneğin bir karışımın sabit bir faz üzerinde (gözenekli), hareketli bir çözücü yardımıyla, karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketleri sonucu bileşenlerine ayrılmasıdır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*high performance liquid chromatography* (HPLC)), en yaygın kullanılan ve metodolojisi olgunlaşmış analitik tekniktir. Farmasötik, klinik kimya, gıda, çevre ve sentetik kimya gibi alanlarda 50 yıldan fazla süredir kullanılmaktadır [Claessens and Van Straten, 2004; Hewitt and Marvin, 2005; Olsen et al., 2006; Eijkel, 2007; Sadılek et al., 2007; Hosoya et al., 2008]. Güvenilir ve çok yönlü olması nedeniyle popülerliği gün geçtikçe artmaktadır [Eijkel, 2007]. Kromatografide seperasyon mekanizması sabit faz, hareketli faz ve analit arasındaki interaktif ilişkiye bağlıdır. Cihaz hareketli faz taşıma sistemi, injeksiyon sistemi, tubing ve bağlantı sistemi ve dedektör kısımlarından oluşmaktadır. Oldukça hassas bir cihaz olması nedeni ile kullanım öncesi, kullanım sırası ve kullanım sonrası dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Detekte edilmek istenen bileşiğe uygun sabit ve hareketli faz seçimi gerekmektedir. Deteksiyonun gerçekleştirileceği dedektör, uygun koşullarda çalışacak şekilde bilgisayar aracılığıyla yönlendirilir. Bu çalışmada bazı fenolik bileşikler (gallik asit, kuersetin vb.), organik asitler (askorbik asit) ve şekerler (fruktoz, glukoz ve sükroz) gibi bazı fitokimyasallar HPLC aracılığıyla detekte edilmiştir. Şekerler refraktif indeks dedektörü ile, diğer bileşikler ise UV dedektörü ile detekte edilmiştir. Standart bileşiklerin var olması durumunda oluşturulacak bir kalibrasyon eğrisi ile hedef bileşiğin konsantrasyonu doğrudan hesaplanabilir.

Spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerin yanında renk değişimine dayalı bazı biyokimyasal testler aracılığıyla bitkisel ekstraktların içerdiği kinon, kumarin, tannin ve saponin gibi önemli fitokimyasal gruplarının varlığı kalitatif olarak test edilebilmektedir. Bitkisel ekstraktların kinon içeriği sülfürik asit eklendiğinde kırmızı [Jacob and Shenbagaraman, 2011], kumarin içeriği sodyum hidroksit eklendiğinde sarı [Dominguez, 1973], tannin içeriği ferrik klorür eklenmesi ile mavimsi-yeşilimsi siyah renk oluşturması ile ve saponin içeriği ise etanol eklenip karıştırıldığında köpürmesi ile [Rathore et al., 2012] ayırt edilebilmektedir.

2.2. Antimikrobiyal ajanlar

Birçok farklı alanda problem olabilen bakteriyel büyümenin ve bu durumun sebep olduğu biyofilm oluşumunun kontrolü için doğal veya sentetik ajanlar kullanılmaktadır. Hastalık tedavisinde özellikle implant uygulamalarından sonra enfeksiyon kontrolünde antibiyotikler; gıda endüstrisinde gıda koruyucu olarak kullanılan peptidler, organik asitler ve fenolikler yaygın antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmaktadır.

2.2.1. Antibiyotikler

Antibiyotik terimi *antibiyosis* sözcüğünden kökenlenir ve canlılık karşıtı demektir. Önceden bir mikroorganizmanın ürettiği ve diğer türlere toksik olan organik bileşikler antibiyotik olarak adlandırılmaktaydı [Etebu and Ariekpar, 2016]. Yani “antibiyotik” kavramı biyolojik kökenli mikrobiyal büyüme engelleyicileri ifade etmekteydi [Etebu and Ariekpar, 2016]. Fakat teknolojinin ilerlemesi ile antibiyotiklerin kısmen veya tamamen sentezlenebilir olması, tüm bu grubu antibiyotik olarak adlandırmaya sebep olmuştur [Etebu and Ariekpar, 2016]. Antibiyotikler ve antimikrobiyal ajanlar bakteriler, mantarlar veya virüslerin büyümesini kontrol altına alabilen bileşikler olarak kabul görmektedir [Russel, 2004; Brooks et al., 2004].

Antibiyotikler moleküler yapı, etki mekanizmaları ve etki spektrumlarına göre sınıflandırılmaktadır [Etebu and Ariekpar, 2016]. Kimyasal yapılarına göre antibiyotikler Çizelge 2.1’deki gibidir. Antibiyotikler, hücre duvarı sentezini inhibe ederek, hücre zarı yapılarını veya işlevini bozarak, nükleik asitlerin yapısını ve işlevini bozarak, protein sentezini inhibe ederek ve diğer bazı anahtar metabolik yolları engelleyerek mikrobiyal büyümeyi inhibe etmektedirler [Madigan and Martinko, 2006; Talaro and Chess, 2008; Wright, 2010].

Çizelge 2.1: Kimyasal yapılarına ve etki mekanizmalarına göre antibiyotikler [Etebu and Ariekpar, 2016].

Antibiyotik grubu	Etki mekanizması	Örnek
Beta-laktamlar	Proteinlerle etkileşime girmek, bakteriyel hücre duvarının sentezini engellemek	Penisilinler
		Sefalosporinler
		Monobaktamlar
		Karbapenem
Makrolidler	Bakteriyel protein sentezini inhibe etmek. Polipeptid zincirine aminoasit eklenmesini önlemek.	Eritromisin
		Azitromisin
		Klaritromisin
Tetrasiklinler	Ribozoma etki etmek, polipeptid zincirine aminoasit eklenmesini engellemek	Klorotetrasiklin
		Oksitetrasiklin
		Demeklosiklin
Kinolonlar	DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonu ile etkileşime girmek	Sparfloksasin
		Nalidiksik asit
		Enoksasin
		Siproaksin
Aminoglikosidler	Protein sentezini ribozomal altbirimlere bağlanarak inhibe etmek	Streptomisin
		Gentamisin
		Tobramisin
		Amikasin
Sülfonamidler	Folik asit ve p-aminobenzoik asit döngüsünde kompetitif inhibitör olarak etki ederek bakteriyel büyümeyi engellemek	Sulfasalazine
Glikopeptidler	Bakteride hücre duvar sentezini inhibe etmek	Dalbavansin
Oksazolidinonlar	Bakteride protein sentezini ribozomal 50S alt birimine bağlanarak engellemek	Linezolid

2.2.2. Gıda endüstrisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar

Antimikrobiyal kavramı virüsler, bakteriler, mantarlar veya parazitlere karşı büyüme engelleyici veya öldürücü özellikteki ajanlar için genel olarak kullanılabilecek bir kavramdır. Alexander Fleming'in 1922'de lizozimi keşfetmesi ile modern anlamda doğal bağışıklığın doğuşu başlamış kabul edilir. Bunun yanında, çeşitli canlılardan izole edilen 3240 adet antimikrobiyal peptid belirlenmiş ve bu peptidlerin bazı ortak özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Çoğunlukla katyonik olmaları, anyonik birkaç tanesinin asidik aminoasitlerden olan aspartik ve glutamik asit içerdiği, çok kısa aminoasit zincirlerinden oluşmaları antimikrobiyal peptidlerin ortak özelliklerindendir [Huan et al., 2020]. Antimikrobiyal peptidler kaynaklarına göre Çizelge 2.2'deki gibi gruplanmaktadır:

Çizelge 2.2: Kaynaklarına göre antimikrobiyal peptidler [Huan et al., 2020].

Antimikrobiyal peptidin kaynağı	Antimikrobiyal peptidin adı	Kaynak
Memeli	Kathelisidin, defensin, laktoferrin, kazein	Akalin, (2014)
Akuatik	As-CATH4; pardaksin	Huang et al. (2018); Semreen et al. (2018)
Bitkisel	Hionin, Defensin ve snakin	Tang et al. (2018)
Mikrobiyal	Nisin, Gramisidin	Cao et al. (2018)
Böcek	Sekropin, Jellein	Dutta and Bhattacharyya (2013); Zahedifard et al. (2020)
Amfibi	Magainin, Kankrin	Lu et al. (2008); Conlon and Mechkarska (2014)

Gıdalar fiziksel, kimyasal veya biyolojik bulaşlar nedeniyle enfeksiyona veya diğer hastalıklara sebep olacak etmenlerden uzak olmalıdır [Bose et al., 2023]. Gıda işlemede; hazırlığın gerçekleştirildiği ortamı mikrobiyal yükten arındırmak, hazırlık esnasında düzenlemelere uygun koruyucular eklemek, üretim sonrası etkin

yöntemlerle paketlemek ve uygun koşullarda muhafaza etmek tüketiciye korunmuş bir gıda sunmayı mümkün hale getirir. Gıda kaynaklı hastalıkları doğrudan gıda tüketimi esnasında enfeksiyona sebep olan mikroorganizmanın kişiye bulaşması (gıda kaynaklı enfeksiyon) ile veya mikroorganizmanın ürettiği toksinlerin kişide bazı hastalıklara sebep olması (gıda zehirlenmesi) ile gerçekleşebilmektedir. Bu durumu önleyebilmek adına antimikrobiyal etkili koruyucuları kullanmak gerekebilmektedir. Tüketici sağlığını korumanın yanında gıda israfının da önüne geçebilmek için gıda koruyucu olarak antimikrobiyal ajanların kullanımı önemlidir. Gıdalarda bozulmanın ana sebeplerinden biri mikrobiyal kontaminasyondur. Gıda krizinin olduğu şu dönemde işleme esnasında çürümeden kaynaklı gıda israfını minimuma indirmede antimikrobiyal etkili gıda koruyucuların önemi artmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar, mikroorganizmaların büyümesini; protein yapısını bozma, hücre duvar yapılarının sentezini engelleme, genetik materyalin replikasyon, transkripsiyon ve translasyonunu bozma veya hücre dış yapılarını hedef alma gibi mekanizmalarla kontrol altında tutabilir [Bose et al., 2023]. Halen gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılan organik asitlerden sorbik asit, benzoik asit, propiyonik asit veya askorbik asit gibi ajanların bazı mikroorganizmalarda sitoplazmik pH değerine ve hücre zarı geçirgenliğine etki ettiği belirtilmiş ve bu bileşiklerin antimikrobiyal ajan olarak da kullanılabileceği belirlenmiştir (Çizelge 2.3) [Khare et al., 2020; Bose et al., 2023]. Sentetik ajanların yanında fesleğen, ökaliptus, hardal, kekik, soğan, sarımsak ve mercan köşk gibi otlar veya baharatlardan elde edilen sulu veya alkolik bitki ekstraktlar ve esansiyel yağların da benzer amaçlarla kullanılabileceğini rapor eden çalışmalar mevcuttur (Çizelge 2.4) [Nile et al., 2020; Wang et al., 2020; Bose et al., 2023].

Çizelge 2.3: Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal etkili organik asitler [Bose et al., 2023].

Organik asitler	Antimikrobiyal etki	Kaynak
Malik asit	<i>L. monosytogenes</i> , <i>S. gaminara</i>	Coban (2020)
Fenillaktik asit	<i>E. cloacea</i>	Liu et al. (2018)
Propiyonik asit	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>	Liu et al. (2012)
Sitrik asit	<i>Sh. Flexneri</i>	Song et al. (2022)
Sorbik asit	Maya ve küf	Eastoe (2016)
Oksalik asit	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>	Kumar et al. (2018)
Asetik asit	<i>Shigella</i>	Venugopal (2016)
Potasyum sorbat	Bakteri ve küf	Jideani and Vogt (2016)
Sodyum sitrat	<i>Listeria</i> ve <i>E. coli</i>	Morey et al. (2014)
Allil isotiyosiyanit	<i>E. coli</i>	Huang et al. (2019)

Çizelge 2.4: Gıda endüstrisinde kullanılan bitkisel antimikrobiyal ajanlar ve kullanılan gıda ürünleri [Bose et al., 2023].

Antimikrobiyal ajan	Kullanılan Gıda ürünü	Hedef mikroorganizma	Kaynak
Wasabi ekstraktı	Çiğ et	<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> , <i>fungi A. niger</i> , <i>P. italicum</i>	Chana-Thaworn et al. (2011)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Peynir	<i>S. aureus</i>	Kuorwel et al. (2011)
Üzüm çekirdeği ekstraktı	Domuz filetosu	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>B. thermosphaceta</i> B2	Díaz-Montes (2022)
Mısır zeini	Yemeye hazır tavuk	<i>L. monocytogenes</i>	Mukurumbira et al. (2022)
Pimienta esansiyel yağı	Biftek dilimi	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>E. coli</i> O157:H7	Trindade et al. (2022)

2.2.3. Bitkisel kaynaklı antimikrobiyal ajanlar ve etki mekanizmaları

Antimikrobiyal etkisi olan fitokimyasallar genellikle; fenolikler, alkaloidler, lektinler, polipeptidler, terpenoidler, esansiyel yağlar ve poliasetatlardır [Omojate Godstime et al., 2014]. Bitkisel antimikrobiyaller yapılarına göre esansiyel yağlar, fenolikler, alkaloidler, saponinler ve peptidler olmak üzere gruplandırılabilir [Ferdos, 2018]. Sekonder metabolitler olarak da adlandırılan fenolikler, bitkilerde biyotik ve abiyotik faktörlere karşı bir yanıt olarak üretilir. Antimikrobiyal özellikli fenolikler; flavonoidler, fenolik asitler, tanninler, stilbenoidler, kinonlar ve kumarinler olarak gruplandırılmaktadır [Bouarab-Chibane et al., 2019]. Bu bileşiklerin düşük maliyet ile temin edilecek bir bitkisel hammadde içerisinde yeterli miktarda bulunabilmesi oldukça önemlidir. Antimikrobiyal ilaç direncinin giderek artması yeni antimikrobiyal araştırmacıları öncü moleküller araştırmaya yönlendirmiştir [Smeriglio et al., 2017]. Bazı durumlarda sentetik ilaçların başarısız olduğu, etkisiz olmaları bile sentetik olmaları nedeniyle hastaya olumsuz etkileri olabileceğinden alternatifler aranmaktadır [Smeriglio et al., 2017]. Flavonoidlerin antibiyotiklerin etkisini arttırdığı da rapor edilmiştir [Bernal et al., 2009; D'Arrigo et al., 2010; Eumkeb et al., 2010]. Bu bağlamda flavonoidlerin bir antibiyotiğin yerine kullanımı sonucu elde edilen etkisi düşük olsa bile antibiyotikler ile kullanılması bakteriyel üremenin kontrolünde avantaj sağlayabilecektir.

Tarımsal ürünleri işleyen endüstriyel firmalar fenoliklerce zengin ürünler, yan ürünler veya atıklar açığa çıkarmaktadır ve bu ürünler doğal antimikrobiyal ajan eldesi için oldukça kıymetli doğal kaynaklardır. Bitki ekstraktlarından uçucu olan ve olmayan antimikrobiyal moleküller elde edilebilmektedir. Antimikrobiyal fenoliklerin elde edildikleri hammaddeler, etki spektrumları, etki mekanizması çeşitliliği onların önemlerini arttırmaktadır.

Bitkisel sekonder metabolitler mikroorganizmalara, hücre zarının lipit çift tabakasındaki membran proteinlerine ve makromolekül sentezinde görevli enzimlere etki ederek, hücre zarı geçirgenliğini artırarak, proton hareket güç kaybına ve hücresel materyal kaybına neden olarak zarar verir [Topuzović et al., 2015]. Mikroorganizmalar üzerinde büyüme kontrolünde fenoliklerin kullanımının amaçlandığı çalışmalarda en çok rapor edilen etki mekanizması hücre zarı seviyesinde gerçekleşen antimikrobiyal aktivitelerdir. Zar seviyesinde etkinlik; zar geçirgenliğinin geri dönüşümlü

artmasından, zararın tamamen geri dönüşümsüz zarar görmesine kadar değişmektedir. Fenoliklerin hücre zararına etkisi; zar potansiyeline etkisinin, zar geçirgenliğinin, sitoplazmik pH'ın değişiminin ve sitoplazmik enzim aktivitesinin belirlenmesi amaçlanarak akım sitometrisi tekniklerinden faydalanılarak saptanabilmektedir [Léonard et al., 2016]. Fenoliklerin antimikrobiyal etkilerini açıklamada en önerilen yaklaşım, bulundurdıkları –OH gruplarının hücre zararına bağlanmasıdır. Hücre zararına hidrojen bağı ile bağlanması aracılığıyla hidrofobikliklerine bağlı olarak fenolik bileşikler, hücre yüzeyinde birikebilir, yüzeye nüfuz edebilir ve hatta zardan hücre içine geçebilir. Böylelikle farklı hücre bileşenleri ile etkileşime geçerek sitoplazmik pH'ı değiştirebilir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı hidrofilik olduğundan, fenolik bileşiklerin hidrofobik bileşenlerine daha dayanıklıdır. Borges et al. (2013) çalışmasında fenolik uygulamasının Gram pozitiflerde elektron alıcılığını artırırken Gram negatiflerde azalttığını belirlemiştir. Sonuç olarak, hücre duvar yapısı ve bileşenlerinin fenoliklerin antimikrobiyal etkinliklerinde anahtar role sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur [Borges et al., 2013; Møretro et al., 2013; Topuzović et al., 2015]. Ayrışmamış formdaki fenolikler, kendi pKa değerlerinin altındaki pH değerlerinde yüksüz gibi davranırlar ve fosfolipid çift tabakadan geçerler. Hücre içine girdikten sonra antimikrobiyal fenolikler DNA, RNA ve protein sentezini engellemeye ve sitoplazmanın koagülasyonuna neden olabilir. Mora-Pale et al. (2015) çalışmasında, resveratrolün DNA giraz aktivitesini ve hücre bölünmesinde görevli DNA bağlama proteinlerini inhibe ettiğini belirlemiştir. Fenolik bileşikler zar proteinleri ile de etkileşime girebilmektedir. Duggirala et al. (2014), kumarin ve skopoleinin, hücre bölünme proteini FtsZ'nin etkinliğini inhibe ettiğini rapor etmiştir. Ayrıca kumarinin bu çalışmada *B. subtilis*'in uzunluğunu arttırdığını, bu durumun da hücre bölünmesi aşamasında septum oluşumunun engellemesi nedeniyle olabileceği öngörülmüştür. Fenoliklerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlerken hedefe dayalı mekanizmalarını belirlerken transkriptomiks [Alvarado-Martinez et al., 2020], proteomiks [Ozdemir and Soyer, 2020] ve metabolomiks [Wu et al., 2020] çalışmaları da gerçekleştirilmektedir.

2.2.4. Antimikrobiyallerle bakteriyel büyümenin kontrolü

Birçok farklı alanda diğer canlılar için sorun olabilen bakterilerin miktarının kontrol altına alınabilmesi oldukça önemli bir konudur. Sorun olduğu ortamda bakterilerin

aşırı üremesini durdurmak veya üremesini tamamen engellemek bu amaçla izlenecek yollardandır. Tam anlamı ile steril koşulların teorik olarak sağlanma olasılığı olmayan durumlarda, üremeyi belirli bir seviyede tutmak bakteriyostatik kontrol olarak adlandırılır [Pankey and Sabath, 2004]. Bakteriyostatik özellikte bir ajan ortamda bulunan tüm bakterileri öldüremez, belirli bir seviyede ölüm veya inhibisyon sağlar. Buna karşın, tam sterilitenin hedeflendiği durumlarda ise bakteriyel yükün tamamının ortadan kaldırıldığı bakteriyosidal etkiden söz edilebilir. Oransal açıdan değerlendirildiğinde teorik olarak ortamdaki bakteriyel yükü %99.9 oranında azaltan ajanlara bakteriyosidal ajanlar denilmektedir [Pankey and Sabath, 2004]. Farklı alanlarda kullanılan sentetik ajanlar ile her iki türde bakteriyel üreme kontrolü sağlanabilmektedir. Gıda temaslı yüzeylerin dezenfeksiyonunda kuarterner amonyum bileşikler, amfoterik bileşikler, hipokloritler, peroksitler (perasetik asit ve hidrojen peroksit), aldehitler (formaldehit, gluteraldehit, paraformaldehit) ve fenolikler kullanılmaktadır [Holah et al., 2002]. Bunların yanında alkil aminleri ve klor dioksitler de dezenfeksiyon programlarına eklenebilmektedir. Ayrıca alkoller, fenolik bileşikler ve aldehitler de özellikle sağlık alanında kullanılmaya başlanmıştır.

Tüm bu antimikrobiyal ajanların antimikrobiyal etkinliklerini ve etki mekanizmalarını belirlemek amacıyla agar kuyu difüzyonu, ajanın minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının (MBK) belirlenmesi ve zamana bağlı ölüm kinetiğinin takibi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

- Antimikrobiyal ajanın agar kuyu difüzyonu ile etkinliğinin belirlenmesi

Agar kuyu difüzyonu, antimikrobiyal etki belirlemede kullanılan en basit fakat oldukça etkili bir yöntemdir. Uygulama kolaylığı, hızlı sonuç vermesi ve kısa sürede geniş bir tarama imkânı sağlaması nedeniyle genellikle antimikrobiyal etki belirleme çalışmalarının ilk aşama deneylerini oluşturur. Agar ile katılaştırılan geleneksel besiyerleri üzerine test mikroorganizmasının ekilmesinin ardından steril koşullarda açılan eşit çaplı ve derinlikli kuyulara, eşit hacimde ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış antimikrobiyal etkili ajanlar transfer edilir ve test mikroorganizmasının büyüme süresi boyunca optimum koşullarda inkübe edilir. İnkübasyonun ardından eğer antimikrobiyal etki varsa kuyuların çevresinde oluşan zonların çapları ölçülür ve kaydedilir. Çapın büyüklüğüne göre antimikrobiyal ajanın etkinliği hakkında güvelinir seviyede fikir sahibi olunabilmektedir. Bu uygulamada önemli noktalar; besiyerinin katılığının antimikrobiyal ajanın difüzyonunu engellemeyecek miktarda olması,

besiyerlerinin eşit hacimde dökülmesi ve antimikrobiyal ajanın kuyulara transferinden sonra dökülmeden inkübasyon alanına ulaştırılmasıdır. Agar kuyu difüzyonu deneyinin ardından gerekli görülürse daha kompleks yöntemler kullanılarak çalışma yönlendirilir.

- Antimikrobiyal ajanın minimal inhibisyon ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi

Herhangi bir antimikrobiyal ajanın etkinlikteki başarısını işaretlerinden biri, minimal inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesidir. Belirli bir oranda (örneğin MIC_{50} : popülasyonu %50 oranında inhibe eden minimum konsantrasyon) bakteri sayısını azaltan en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonuna bu ajanın minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) denir. Minimal bakterisidal konsantrasyon ise, popülasyonun %99.9 oranında azalmasına neden olan minimum antimikrobiyal ajan konsantrasyondur (MBK). Bunun için, antimikrobiyal ajan ve test mikroorganizması mikrotitrasyon plakalarında veya cam tüplerde birlikte inkübe edilir. Antimikrobiyal ajan farklı oranlarda geniş bir konsantrasyon taraması sağlayacak şekilde seyreltilir. Mikroorganizmanın büyüme süresine göre devam ettirilen inkübasyonun sonunda, kültürden steril koşullarda örnek alınır ve gerektiğinde seri dilüsyon yönteminden faydalanılarak seyreltilerek absorbands takibi ile veya katı besiyerine ekim yaparak canlı sayımı gerçekleştirilir. Pozitif ve negatif kontroller ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılır. Elde edilen sonuçlar ile antimikrobiyal ajanın MIC ve MBK değerleri belirlenir.

- Antimikrobiyal ajanın zamana bağlı ölüm kinetiğinin belirlenmesi

Antimikrobiyal özellikte olduğu düşünülen ajanın etkisini zamana bağlı olarak değerlendirmeyi sağlayan bir yöntemdir. Antimikrobiyal ajan etki etmesi beklenen mikroorganizma ile optimum koşullarda inkübe edilir. Inkübasyon devam ederken bakterinin büyüme hızını göz önünde bulundurarak periyodik olarak kültürden steril koşullarda örnek alınır ve gerektiğinde seri dilüsyon yönteminden faydalanılarak seyreltilerek absorbands takibi ile veya katı besiyerine ekim yaparak canlı sayımı ile büyüme takip edilir. Pozitif ve negatif kontroller ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılır. Elde edilen sonuçlar, antimikrobiyal ajanın bakterisidal veya bakteriyostatik etkinliğinin süresini öğrenmemize yardımcı olur.

2.2.5. Antimikrobiyallerle bakteriyel hareketin kontrolü

Genel olarak bakteriyel hareket türleri yüzme, süzülme, titreşim ve kayma olarak gruplandırılmaktadır. Bakteriyel hareket, doğrudan hareketi sağlayan flagella, pili gibi uzantıların işlevini sağlayan proteinlerin sentezi veya hareketi tetikleyen faktörlerin hedeflenmesi ile dolaylı yoldan kontrol altına alınabilir. Farklı mekanizmaların spesifik olarak inhibisyonu bakteriyel hareketi yavaşlatabilir veya tamamen durdurabilir. Bu sayede bakteriyel hareket aracılığı ile sağlanan kolonizasyon, biyofilm oluşumu, iletişim, virulans gibi diğer birçok fizyolojik aktivite de durdurulmuş olur. Bakteriyel hareket bazı antibiyotikler ile kontrol edilebilmektedir. Diğer mekanizmalarda olduğu gibi bakteriyel hareketin kontrolü için de doğal ajanların etkinliğini değerlendirmek önemlidir. Yapılan çalışmalarda bakteriyel hareketin bitkisel ekstraktlar aracılığı ile kontrolünün çoğunlukla *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı değerlendirildiği görülmüştür. 95 farklı bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktlar ile bir çalışma gerçekleştirilmiş ve ekstraktların bakteriyel hareket üzerine etkisi incelenmiştir. Bu bitkiler arasında en yüksek bakteriyel hareket inhibisyonu (süzülme) %71 oranı ile tarçın bitkisinin (*Cinnamomum verum*) yapraklarından elde edilen etanol ekstraktı ile sağlanmıştır [Alva et al., 2019]. Koh ve Tham (2011) ise çalışmalarında bazı geleneksel Çin tıbbi bitkilerinin ekstraktlarını (*Prunus armenica*, *Punica granatum*, *Lycium chinense* vs.) *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı bakteriyel hareket inhibitörü olarak test edilmiş ve bakteriyel hareketin (süzülme) %29-79 oranlarında inhibe edildiği görülmüştür [Koh and Tham, 2011]. Bu ve benzeri çalışmalar ile patojenitenin önemli bir işaretçisi olan bakteriyel hareketin doğal ajanlar aracılığı ile kontrolünün mümkün olduğu ortaya konulmuştur.

2.2.6. Antimikrobiyallerle bakteri hücre duvarı ve hücre zarı bütünlüğüne etkisi

Bakteriler hücre duvarında peptidoglikan bulundurlar, bu yapı hücre şeklini ve yapısını korur [Yap et al., 2021]. Hücre zarı ise çift fosfolipid tabakadan oluşur ve hücrede geçirgenlik ve bariyer oluşturma gibi önemli fonksiyonları yerine getirir [Yap et al., 2021]. Gram pozitif bakterilerin aksine Gram negatif bakteriler lipitlerce zengin dış zara ve ince peptidoglikana sahiptirler. Gram negatif bakterilerin dış zarının temel bileşeni lipopolisakkariddir (LPS) [Yap et al., 2021]. Lipidlerin ve porinlerin

oluşturduğu bir bariyer ile dışarıdan gelen antibiyotik, deterjan, boya gibi bakteri için toksik olabilecek bileşiklerden iç zarın zarar görmesini engeller [Yap et al., 2021].

Bakterilerde sitoplazmik zar antimikrobiyal bileşiklerin hedeflerinden biridir [te Winkel et al., 2016]. Bu bileşikler antimikrobiyal özelliklerini hücre zarının dış faktörlere karşı bariyer oluşturma özelliğine zarar vererek gerçekleştirirler [te Winkel et al., 2016]. Bu nedenle antimikrobiyal etkinlik belirleme çalışmalarında zar geçirgenliği veya zar potansiyelindeki değişikliklerin belirlenmesi oldukça önemlidir [te Winkel et al., 2016].

Bakteri hücre zarını bir bütün halinde biyolojik olarak işlevsel ve seçici geçirgen evrede tutmak, bakteri hücreleri için canlılığın sürdürülebilmesi için önemlidir [Buttress et al., 2022]. Bunu gerçekleştirme yollarından biri hücre zarının elektriksel potansiyelini düzenleyebilmesidir [Buttress et al., 2022].

Zar potansiyeli hücre içi ve hücre dışı potansiyel farkına denir ve bakteriyel metabolizmada oldukça önemlidir [Yap et al., 2021]. Ayrıca zar potansiyeli bakteri hücrelerinde önemli bir biyoenerjetik parametredir [Buttress et al., 2022].

Zar potansiyelinin hasarına neden olan etken, net elektriksel potansiyel ve zar proton gradiyenti bileşenlerinin incelenmesi ile belirlenebilir [Mitchell, 1961]. Bir antimikrobiyal ajan nedeni ile zar potansiyelinin veya zar işlevinin bozulması bu hücresel işlemleri sekteye uğratar [te Winkel et al., 2016]. Zar potansiyelinin düşmesi zarın yapısal olarak zarar görmesi ile ilişkilidir [Yap et al., 2021].

Eğer net potansiyel bir antimikrobiyal ajan tarafından tehlikeye sokulursa, zar proton gradiyenti de antimikrobiyal ajanın sebep olduğu değişiklikleri yatıştırabilmek için ilişkili bir şekilde artış gösterir [Ellis et al., 2019].

Proton hareket güç (PHG), hücre zarı boyunca geçen protonun, elektrokimyasal potansiyel farkıdır. PHG, elektrik potansiyeli ($\Delta\psi$) ve transmembran proton gradiyenti (ΔpH) olmak üzere iki bileşene sahiptir [Mitchell, 1961]. PHG'ün bozulması:

- ATP sentezi,
- Stres yanıtı,
- Aktif taşıma,
- Polipeptid katlanması,
- Altbirim agregasyonu ve

- Protein fosforilasyonu gibi fizyolojik aktiviteleri olumsuz etkiler [Kragol et al., 2001; Yuroff et al., 2003; Klipp et al., 2005; Watanabe et al., 2005; Deutscher et al., 2006; Kipnis et al., 2007; Rieger et al., 2021].

Ökaryotlarda PHG mitokondri, solunum zinciri ve ATPaz aktivitesi esnasında ortaya çıkar. Tüm biyolojik sistemlerde, enerjinin çoğu nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) tarafından yüksek enerjili elektron formunda substratlardan besin transferi ile gerçekleşirken olur. Elektron taşıma sistemindeki elektron araçları boyunca taşındıktan sonra bu elektronlar, mitokondri iç zarındaki oksijene taşınır. Elektron translokasyonu esnasında, üretilen enerjinin önemli bir kısmı, protonların zarıdan pompalanmasında kullanılır. Spesifik olarak, protonlar mitokondriyel matriksten, intramembran bölgeye transfer edilir, böylece konsantrasyon gradienti ve PHG oluşturulur [Rieger et al., 2021]. Buna kemiozmotik teori denir. Kemiozmotik teori PHG ve ATP sentezinin birlikte çalışmasını açıklayan bir teoridir.

Konsantrasyon gradiyenti nedeni ile H^+ , mitokondriyel matrikse por ve kanallardan girer, bu da ATP sentazı ADP ve inorganik fosfatı etkileşime sokarak ATP oluşumunu sağlar [Berry et al., 2018]. Solunum sekteye uğradığında ATP, PHG'ü sağlamak amacıyla hidroliz edilir.

Prokaryotlarda mitokondri olmadığından solunum zinciri ve ATP sentaz, bakterilerde sitoplazmik zarıda bulunmaktadır. Bakterilerin dallanmış yolakları ve alternatif son elektron alıcıları da bulundurmaları nedeni ile [Cotter et al., 1990] elektron taşıma sisteminde ökaryotlardan daha esnek bir yapıda oldukları söylenebilir [Kaila and Wikström, 2021]. Prokaryotlarda solunum yolakları, çevresel değişimlere kolay uyum sağlar. Örneğin *E. coli*'de oksijen varlığı ve yokluğunda iş yapmak üzere farklı elektron alıcıları vardır. Oksijen varlığında cyoABCDE'nin kodladığı sitokrom o oksijenin gerekli olduğu durumlarda, cydAB'nin kodladığı sitokrom d ise kısıtlı oksijen varlığında son elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır. Oksijenin bulunmadığı ortamda ise nitrat, fumarat ve trimetil oksit gibi son elektron alıcılar iş yapmaktadır [Tseng et al., 1996].

Redoks faktörleri ve kofaktörler arası fiziksel fark, yük ile ayrılmış evrede elektrik potansiyelinin etkilenmesini belirler. Birçok durumda PHG stabil kalır bu iki bileşeni arasında dönüşüm gerçekleşir [Bakker and Mangerich, 1981]. Elektrik potansiyelinin

dağılması, transmembran proton gradiyentinin artmasına neden olur veya bu durumun tam tersi gerçekleşir [Mohiuddin et al., 2022]. Hücre depolarizasyonu veya geçirgenliği esnasında elektriksel potansiyel bozulur. Hiperpolarizasyonda veya kimyasal gradiyent bozulduğunda elektriksel potansiyel artar.

PHG'ün bu iki bileşeni, protonlar ile ilişkilidir. Proton fazlalığı elektriksel potansiyele sebep olurken, zar boyunca protonların hücreden ayrılması transmembran proton gradiyentine neden olur. Elektriksel potansiyel PHG'e transmembran proton gradiyentinden daha fazla katkıda bulunur. Çünkü yük ayrılması esnasında elektriksel potansiyel, daha çok enerji açığa çıkartır.

Zar potansiyelinin hücresel aktiviteler için uygun düzeyde olması gerekmektedir. Ekstrem koşullarda zar potansiyeli sayesinde hücre kendini dış ortamdan izole eder. Bu nedenle elektriksel potansiyel antimikrobiyal etkinlik elde etmek için önemli bir hedeftir. Transmembran proton gradiyenti, içsel zar proseslerinde esasen etkilidir. PHG'ü doğrudan etkiler. Potansiyel elektriksel potansiyel bozucuların antimikrobiyal etkileri, pH değer alkaline düzeyde olduğunda artar, çünkü bu durum proton gradiyentini düşürür. Bunun tersine, asidite arttığında transmembran proton gradiyenti de artar, bu da transmembran proton gradiyenti ilişkili antimikrobiyal etkinin artışına neden olur.

Zar potansiyelindeki değişiklikleri belirlemede, propidyum iyodid (PI) ve Sytox yeşili gibi nükleik asit boyaları [te Winkel et al., 2016], DiSC₃(5) (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine Iodide) ve DiBAC₄(3) (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol) gibi voltaja duyarlı floresan boyalar veya radyoaktif işaretli tetrafenil fosfonyum (TPP⁺) kullanılabilmektedir [Kalyanaraman et al., 2023]. Nükleik asit boyaları hücrenin zar potansiyeli bozulmamış halde iken hücre içine geçemezler. Zar bütünlüğü bozulduğunda hücre içine girerek nükleik asitleri boyar ve zar potansiyelinin bozulduğunu işaret ederler [Roth et al., 1997; Sochacki et al., 2011; Stiefel et al., 2015]. Yine de iyon geçirgenliğindeki değişimi belirlemede nükleik asit boyaları yeterli değildir [Wenzel et al., 2012]. Floresan boyalardan DiBAC₄(3) veya DiSC₃(5), voltaja duyarlılıkları açısından benzerdirler [Bräuner et al., 1984; Epps et al., 1994]. Voltaja duyarlı floresan boyalar genellikle depolarize hücreleri boyarlar [Yap et al., 2021]. Depolarizasyonun gerçekleşmesi her zaman hücrenin ölümü ile sonuçlanmaz, fakat derecesine göre hücresel işlevler etkilendiğini işaret eder [Yap et al., 2021]. DiSC₃(5) pozitif yüklü iken, DiBAC₄(3) negatif yüklüdür bu yüzden zar

potansiyeline bu boyaların tepkisi birbirinin tam tersidir [te Winkel et al., 2016]. Zar potansiyelini belirlemede kullanılan DiBAC₄(3), polarize hücrelerde negatif yükü yüzünden hücreye girmeye çalışırken itilir, bu da iyi seviyede enerjilenmiş hücrelerin düşük floresan vermesi ile sonuçlanır. Zıt olarak depolarize hücrelerde ise boya, hücre içinde potansiyel değişimi olması nedeni ile hücre zarını güçlü şekilde boyar ve yüksek floresan verir [te Winkel et al., 2016].

Hücre içi pH değerinin antimikrobiyal etki kaynaklı değişmesini belirlemeyi sağlayan CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), lipofilik özellikte bir moleküldür. Hücre dışındayken floresan özelliği olmayan bu boya molekülü hücre içine alınmasını takiben hücre içerisinde geçirdiği değişikliklerden sonra az miktarda floresan verir. Hücre içindeki esteraz, CFDA-SE'deki asetil grubunu keser ve bu sayede molekül floresan olarak görünür hale gelir. Süksinimidil ester grubu intraselüler ester grubuna kovalent olarak bağlanır. Floresan özellikte olmayan CFDA-SE, hücre içine pasif olarak girer, hücre içinde bulunan esterazlar asetil grubunu siler ve CFSE oluşur. Bu bileşik hücredeki proteinlere kovalent bağlanır ve boyanın hücrede tutulu kalmasını sağlar [Yang et al., 2023]. İmmunolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan CFDA-SE, bakteriyel aktivitenin işaretçisi olarak da sıkça kullanılmaktadır. Bazı yenilebilir ve tıbbi bitkilerden elde edilen çeşitli ekstraktlar (etanol, metanol ve su) ile *Vibrio cholerae* suşlarına karşı gerçekleştirilen bir çalışmada hücre zarı potansiyelinin ve sitoplazmik pH'ın değişimi bir çalışmada incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda tatlı akasya kabuğu ekstraktının sitoplazmik pH değerini düşürmede en etkili ekstrakt olduğu belirlenmiştir (pH 7.2'den 3.9'a düşmüştür). Zar potansiyelini hiperpolarizasyon yönünde en çok etkileyen ekstraktın yine tatlı akasya olduğu, depolarizasyon yönünde etkileyen ekstraktın ise dikenli incir bitkisinin kladod ekstraktı ile elde edildiği görülmüştür [Sánchez et al., 2010]. Zeytinyağı polifenolleri ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada, *B. cereus* suşlarında uygulamanın depolarizasyona neden olduğu belirlenmiştir [Fei et al., 2019]. Bamya çiçeği, biberiye, yonca ve kekik ekstraktlarının *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı etkisi incelenen başka bir çalışmada, ortama ilgili ekstraktları eklemenin her iki bakteride de sitoplazmik pH değerini ciddi seviyede düşürdüğü gözlenmiştir. İlişkili bir şekilde zar potansiyelinin de ekstrakt uygulamasından sonra kontrole göre belirgin seviyede düşüş gösterdiği rapor edilmiştir [Gonelimali et al., 2018].

2.3. Antibiyofilm ajanlar

Çeşitli yüzeylerde sorun olan biyofilmin kontrolü, biyofilm oluşumunu engelleyerek veya biyofilm oluşumunda etkili olan çevresel veya bakteriyel faktörleri kaldırarak veya önleyerek, bakteriyel iletişim [Rossi et al., 2022] veya bakterilerde patojeniteyi sağlayan hareketliliği inhibe ederek sağlanabilir. Biyofilm, tüm kronik mikrobiyal enfeksiyonların %80'inin patogeneğinde önemli bir belirteçtir [Sharma et al., 2019]. İnsan dokularında oluşan biyofilm, sistik fibroz, endokardit, osteomyelit, otitis media, idrar yolu enfeksiyonları, diş çürükleri ve periodontit gibi enfeksiyonlara neden olabilir [Costerton et al., 1999]. Ayrıca, tıbbi implantlar, gıda temas yüzeyleri veya endüstriyel işlemlerdeki drenaj boruları gibi cansız yüzeylerde de oluşabilir. Biyofilm içindeki mikropların antimikrobiyal toleransı, planktonik olanlardan 10-1000 kat daha yüksektir [Donlan, 2002]. Bitki türevli bileşenler, antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri nedeniyle önemli bulunmuştur [Tariq et al., 2019]. Fitokimyasal açıdan zengin bitkisel ekstraktların, birden fazla bileşen içermeleri nedeniyle antimikrobiyal direnç yol açma olasılıkları daha düşüktür [Abreu et al., 2012; Truchado et al., 2015]. Biyofilm ve biyofilmler ile ilişkili patojenite özelliklerini kontrol etmede bitkisel ekstraktların kapasitesi sıkça değerlendirilmektedir. Yapılan yeni bir çalışmada, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella bongori*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* ve *Limosilactobacillus reuteri* bakterilerinin biyofilmlerine karşı nar kabuğunun sulu ekstraktları kullanılmış ve biyofilm oluşumunun %70'in üzerinde inhibe edildiği belirlenmiştir [Salim et al., 2023]. Yabani kahve olarak bilinen *Aidia genipiflora*'nın gövde kabuğunun metanol/kloroform (4/1) ekstraktı, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes*, *E. faecalis* ATCC 29212, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922, *Vibrio cholerae* ve *Salmonella typhi* dahil çeşitli bakteri biyofilmlerine karşı uygulanmıştır. Biyofilm inhibisyonunun %3-79 oranları arasında değiştiği belirlenmiştir [Anokwah et al., 2021]. *Cyclamen coum*'un n-bütanol ekstraktı ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada, *P. aeruginosa* bakterisinde biyofilm oluşumunu belirgin şekilde inhibe ettiği, hücre-hücre iletişimini önleyebildiği görülmüştür [Varposhti et al., 2013]. *C. hederifolium* ile yapılan bir çalışmada da ekstraktın *S. aureus* bakterisine karşı antibiyofilm etki gösterdiği saptanmıştır [Abdi Ali et al., 2015]. *Ocimum sanctum* (fesleğen) yapraklarının metisilin dirençli ve metisilin duyarlı suşlara karşı biyofilm inhibe edici potansiyelini

incelenmiş ve *Azadirachta indica* (Hint leylağı) ve *Ocimum sanctum* ekstraktlarının kombinasyonunun, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acetanobacter baumannii* gibi patojenlerin biyofilm oluşumunu önlemede etkili olduğu doğrulanmıştır [Sood and Davis, 2020].

2.3.1. Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilmler mikroorganizmaların hücre dışı polimerik matriks aracılığıyla yüzey ile geri dönüşümsüz bağlanması ile oluşur [O'Toole et al., 2000]. Bu polimerik yapı mikroorganizmalara etkileşim, kooperasyon, besin ve enzime ulaşma, heterojen habitat ve antimikrobiyal tolerans kazandırır [O'Toole et al., 2000; Flemming et al., 2016]. Planktonik formdaki hücreler, sesil forma geçerken çevreden bazı sinyaller olarak bazı fenotipik değişikliklere uğrarlar [O'Toole et al., 2000] ve bu değişiklikler sayesinde güçlü bir biyofilm yapısı oluştururlar. Hücre dışı koşullara hızlı adapte olabilmeleri nedeniyle bakteriler, birçok farklı ortamda biyofilm oluşturabilirler [Renner and Weibel, 2011]. Doğada çoğunlukla çok farklı bakteri suşları içeren biyofilmler yaygın görülse de, nadiren tek bir suşa ait biyofilmler de görülebilmektedir [Dickinson and Bisno, 1993; Adal and Barry, 1996; Archibald and Gaynes, 1997]. Bakteriler, besin varlığı veya yokluğu gibi bazı ortam koşullarının değişmesi sonucunda biyofilm oluşturma fazına geçiş yapabilmektedir [O'Toole et al., 2000]. Yaşam koşullarının değişmesi ile strese maruz kalan bakteriler tarafından yüksek miktarda ekzopolisakkarit (EPS) üretilmesi, UV ve sıcaklık gibi abiyotik faktörlere veya biyosid uygulamalarına karşı dayanımın artması gibi biyofilm ilişkili bazı adaptasyonlar edinilebilmektedir [Deretic et al., 1990; Bayer et al., 1991; May et al., 1991; Dickinson and Bisno, 1993; Boyd and Chakrabarty, 1995; Gacesa, 1998].

Biyofilm oluşumunda substratın fiziksel özellikleri bakterinin fizyolojisini, substrata tutunmasını ve erken evre biyofilm oluşumunu etkiler [Renner and Weibel, 2011]. Genel olarak biyofilm oluşumu beş aşamalı bir süreç olarak ifade edilebilir:

- İlk aşama, hücrelerin geri dönüşümsüz bir şekilde yüzeye tutunması ile başlar. Bakteriler flagella ve pili gibi bazı hücre dışı yapılarının varlığı ile bulundukları ortama tutunacak yapıları oluşturmuş olur [Bullitt and Makowski, 1995; Thomas et al., 2004].

- İkinci aşamada, tutunma DNA, lipid, protein ve lipopolisakkaritlerce zengin EPS salınımı sayesinde kalıcı hale gelir ve böylece hücreler ve yüzey arası adhezyon sağlamlaşır [Renner and Weibel, 2011].
- Üçüncü aşamada, yüzeye kalıcı olarak tutunan hücreler çoğalır ve mikrokoloniler oluşturur, hücre sayısı ile doğru orantılı artan EPS, hücreleri enkapsüle ederek dış ortama karşı dayanıklı hale getirir [Renner and Weibel, 2011].
- Dördüncü aşamada, üç boyutlu olarak büyüyen biyofilm tabakası olgunlaşmıştır. EPS tabakasının koruyucu etkisi bu aşamada daha yüksektir.
- Son aşamada ise hücreler mevcut biyofilmden kopup yeni ortamlara tutunarak yeni biyofilmler oluşturabilir [Renner and Weibel, 2011].

2.3.2. Biyofilm oluşumunu etkileyen etmenler

Bakterilerin yüzeye tutunmaları ile başlayan biyofilm oluşum süreci, fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok etmenin bir arada bulunması ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmaların yüzeylerinin net yükünün negatif olduğu bilinse de yüzeyleri yük açısından heterojendir [Renner and Weibel, 2011]. Bulundukları çevreye uyum sağlamada başarıları, onların biyofilm oluşturmada kapasitelerini etkiler. Bakterinin yüzey uzantıları, yüzey yükü, metabolik evresi ve suşu, biyofilm oluşumunu etkileyen biyolojik faktörlerdendir. Substratın malzemesi, yükü, pürüzlülüğü, ıslanabilirliği ve hidrofilik/hidrofobikliği de biyofilm oluşumunda tutunmanın gerçekleşeceği yüzey ile ilişkili önemli faktörlerdendir [Rossi et al., 2022]. Ayrıca ortam sıcaklığı, besine ulaşılabilirlik, pH veya nem de bakterilerin biyofilm oluşturmada önemli rol oynamaktadır [Houdt and Michiels, 2010; García-Gonzalo and Pagán, 2015].

2.3.3. Biyofilm oluşturan bakteriler

Biyofilm oluşumu, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* gibi çeşitli patojenlerde virülansın bir belirtecidir [Del Pozo, 2018].

- *Pseudomonas* sp.

P. aeruginosa, Gram-negatif çubuk şeklinde bir bakteri olup *Pseudomonadaceae* grubundadır. Genellikle suda, bitkilerde, toprakta ve hayvanlarda yaygın olarak bulunur. Sağlıklı bireylerde nadiren enfeksiyonlara neden olur, ancak bağışıklığı zayıf bireylerde kolayca enfeksiyonlara yol açabilir [Balasubramanian et al., 2013]. *P.*

aeruginosa, antimikrobiyal dirençli suşlarıyla on yılı aşkın bir süredir hastane enfeksiyonlarına yol açan patojenlerinden ilk on bakteri arasında yer almaktadır [Streeter and Katouli, 2016]. Havalandırma ilişkili pnömoniden sorumlu ikinci en yaygın patojen olarak ve AIDS, kistik fibrozis ve yanık yaraları olan bireylerde yüksek ölüm oranına neden olan, kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının yedinci büyük nedeni olarak belirlenmiştir [Hidron et al., 2008; Kerr and Snelling, 2009; Valderrey et al., 2010]. *P. aeruginosa* tıbbi malzemeler (idrar sondaları, implantlar, kontakt lensler vb.) [Wolcott et al., 2013] ve gıda endüstrisi ekipmanları (karıştırma tankları, tanklar ve tüpler) [Römling and Balsalobre, 2012] gibi çeşitli yüzeylere etkili bir şekilde yerleşir ve biyofilm oluşturur.

- *Bacillus* sp.

B. subtilis, genellikle bitkiler ve rizosferleri ile ilişkili olarak bulunan, toprakta yaşayan, patojen olmayan, Gram pozitif bir bakteridir. Fungal hiflerin [Kjeldgaard et al., 2019] ve bitkilerin köklerinin [Noirot-Gros et al., 2020] ve yapraklarının [Cámara-Almirón et al., 2020] da dahil olduğu biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedirler. Ayrıca, doğal *B. subtilis* suşları işlenmiş gıda ürünlerinde biyofilm oluştururlar [Kovács and Dragoş, 2019].

- *Enterococcus* sp.

Enterokoklar fırsatçı patojenler olarak tanınan, insanların ve hayvanların ağız boşluğunun, normal bağırsak mikroflorasının ve dişi genital sisteminin doğal bakterileridir [Mohamed and Huang, 2007]. İdrar yolları, kan dolaşımı, karın içi ve pelvik bölgeler, merkezi sinir sistemi ve cerrahi müdahaleye maruz kalan alanlar gibi alanları enfekte eden yaygın nosokomiyal ajanlardır [Richards et al., 2000]. *E. faecalis*, en yaygın Enterokok türüdür ve insanlardaki Enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından sorumludur [Jett et al., 1994; Jones et al., 2004]. Biyofilm içindeki Enterokoklar, planktonik olarak büyüyen Enterokoklara göre antibiyotiklere daha yüksek direnç gösterirler, bu nedenle Enterokok enfeksiyonuna müdahalede biyofilm oluşumunun potansiyel etkisi önemli olabilir [Mohamed and Huang, 2007]. Enterokoklar aynı zamanda periodontal enfeksiyonda önemli organizmalar olarak bildirilmiştir [Molander et al., 1998; Peciuliene et al., 2000]. *E. faecalis* ve *E. faecium*'un farklı biyomalzemeler üzerinde yapışma [Joyanes et al., 1999] ve biyofilm üretme yetenekleri gösterilmiş ve üreteral stentler [Keane et al., 1994], intravasküler

kateterler [Sandoe et al., 2003], safra stentleri [Dowidar et al., 1991] ve silikon gastrostomi cihazları gibi çeşitli tıbbi cihazlarda ve polimetimetakrilat, silikon ve akrilik gibi göz merceği malzemeleri tıbbi malzemelerde biyofilm üretebildikleri rapor edilmiştir [Kobayakawa et al., 2005].

- *Enterobacter* sp.

Enterobacter sp., Gram negatif çubuk şeklinde bir mikroorganizmadır. Genellikle ve giderek artan bir şekilde nosokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu olan fırsatçı bir bakteridir [Giamarellou, 2005]. *E. aerogenes*, endojen insan gastrointestinal mikroflorasının bir parçasıdır [Muslim et al., 2018]. Ayrıca, karasal ve sucul ortamlarda (su, kanalizasyon, toprak ve gıda) yaygındır [Otter et al., 2010].

- *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus cinsinin bir üyesi olan *S. aureus*, geleneksel olarak reçete edilen çoğu antibiyotiğe direnç gösteren bir mikroorganizmadır. Endokardit, osteomyelit gibi uzun süreli *Staphylococcus* enfeksiyonlarını tedavi etmek zordur. Bu organizmaların, konak bağışıklık sistemlerinden kendilerini savunma yeteneklerinden biri, biyofilm oluşturma yetenekleridir [Leid et al., 2002]. Buna ek olarak *S. aureus*, süt çiftliklerinde mastitise neden olan en yaygın bulaşıcı patojenlerden biridir. Ayrıca, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), antibiyotiklerin (penisilin, sefalekssin, amoksisilin, azitromisin ve klindamisin) yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonucunda sıkça izole edilmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* suşları, insanları enfekte edebilme ve süt ürünlerini kontamine edebilme özellikleri nedeniyle halk sağlığında önemlidir [Unlu et al., 2018]. Gıda endüstrisinde ise, *Staphylococcus* biyofilmi tarafından neden olan kirlilik, başlıca üç alanda yayılır: İlki gıda ham maddelerinin durumudur, bunlar arasında çiğ süt [Akbas and Kokumer, 2015], balık yüzeyi [Bensid et al., 2014], özellikle dondurulmuş gıda, et ve diğer hayvansal gıdalar [de Souza et al., 2014] bulunmaktadır. İkincisi gıda işleme ortamı ve ekipmanları, et kesimhanesi ve tahliye borularıdır. Gözardı edilen bir başka önemli materyal ise operatörlerin vücudu ve giysileridir [Møretrø et al., 2013], bu tarz koruyucu giysiler bakteri tutunması için mükemmel bir alan sağlar. Üçüncüsü ise gıda zinciri, gıda depolama, taşıma ve satış süreçleri sırasında, bakteriyel biyofilm oluşumudur. Temiz olmayan depolama ortamı, uygun olmayan taşıma işlemi veya satış personeli ilişkili hijyen faktörleri ile ilgili standart dışı işlemler biyofilm oluşumunu şiddetlendirebilir [Llorens et al., 2012].

- *Streptococcus* sp.

Streptococcus sp., birçoğu insan veya hayvan mikrobiyotasının bir parçası olan önemli patojenleri içerir. *Streptococcus* cinsi, genellikle zincirler veya çiftler halinde düzenlenmiş Gram pozitif, yuvarlak veya oval hücrelerden oluşur ve çevreye dağılmış olarak bulunabilir ve/veya insanların ve hayvanların cilt ve mukoz membranlarını kolonize edebilir. Birçok *Streptococcus* türü, özellikle ortaya çıkan antimikrobiyal direnç, virülans ve zoonotik potansiyel nedeniyle artan sıklıkta ve ölümcüllükle insan ve/veya hayvan patojeni olarak tanınmış ve bildirilmiştir, bu durum önemli ekonomik kayıplara ve sosyal etkilere neden olmuştur [Haenni et al., 2018; Miranda et al., 2018]. Diş yüzeylerinde oluşan ve diş plağı olarak adlandırılan yapı *Streptococcus* sp.'nin biyofilm oluşturma yeteneğinin sonucudur [Matsumoto-Nakano, 2018]. Glukozil transferazlar, çoklu glukan bağlayıcı proteinler, protein antijen c ve kollajen bağlayıcı protein gibi yüzey proteinleri üretmesi ile *Streptococcus* sp. diş plağını üretir ve diş çürüklerine neden olur [Matsumoto-Nakano, 2018].

2.3.4. Biyofilmlerin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

- Mikrotitrasyon plakası/doku kültürü plakası yöntemi

Polistiren malzemeden üretilmiş steril mikrotitrasyon veya doku kültürü plakalarında gerçekleştirilen biyofilm çalışmaları, küçük hacimde çok değişkenli deneyleri gerçekleştirmede oldukça etkilidir. “U” tabanlı 96 kuyulu mikro plakaların genellikle tercih edildiği çalışmalarda, antibiyofilm ajan ile inkübe edilen test mikroorganizması genellikle bir miktar şeker içeren triptik soy sıvı besiyerinde büyütülür. Hedeflenen biyofilm olgunluğuna göre inkübasyon süresi belirlenir (bu çalışmada olgun biyofilm için 48 saatlik inkübasyon tercih edilmiştir). İnkübasyonun ardından oluşan biyofilm, biyofilme tutunan bir boya ile boyanır ve ilgili absorbans değerinde ölçülerek oluşan biyofilmin şiddeti yarı kantitatif olarak belirlenir [Unlu et al., 2018; Balaban et al., 2021] .

- Floresan mikroskobu

Biyofilm çalışmalarında biyofilm tabakasının canlı/ölü hücre durumları floresan özellikteki boyalar ile görüntülenebilir hale gelmektedir. Bu amaçla kullanılmak üzere geliştirilen kitler mevcuttur. Kitler genellikle canlı ve ölü hücreleri ayrı ayrı boyayacak şekilde iki farklı boyanın karışımından oluşmaktadır. Bu çalışmada LIVE/DEAD

BacLight bakteriyel canlılık kiti kullanılmıştır. Membran bütünlüğü açısından hücrenin canlılığını belirlemede kullanılan bir kit olan LIVE/DEAD BacLight, hücre zarı zarar görmüş, ölü veya ölmekte olan hücreleri içerdiği propidium iyodid (PI) isimli boya ile kırmızı boyanırken, sağlam bir zarı olan hücreleri içerdiği SYTO9 isimli boya ile yeşile boyar. Diğer yöntemler ile kabaca inhibisyonunu belirleyebildiğimiz biyofilm tabakasındaki hücrelerin canlı/ölü durumunu görsel olarak floresan mikroskobu altında ilgili filtreler yardımı ile görüntülemek mümkündür.

2.3.5. Biyofilmlerin kontrolünde kullanılan yaklaşımlar

Biyofilm tutunması farklı özelliklere sahip birçok yüzey üzerinde gerçekleşebilmektedir. Özellikle endüstriyel üretim ve işleme esnasında mikroorganizmaların tutunmasına uygun ortam koşulları gelişmektedir. Boru, hazırlık masaları, filtreler, bıçaklar gibi bazı araçlar biyofilm oluşumunun en sık görüldüğü yerlerdir [Rossi et al., 2022]. Bakterilerin bu yüzeylere kalıcı tutunması yüzeylerde metal korozyonu, ısı transferinin azalması, mekanik blokaj ve filtrasyon membranlarının geçirgenliğinin azalması gibi bazı olumsuzluklara neden olmaktadır [Tang et al., 2009; García-Gonzalo and Pagán, 2015; Galié et al., 2018].

Herhangi bir yüzeyde oluşan biyofilmin kontrolü; biyofilm oluşumunun önlenmesi veya azaltılması, oluşan biyofilmin oradan kaldırılması ve biyofilm oluşumunda etkili çevresel faktörlerin önlenmesi ile gerçekleştirilebilmektedir [Rossi et al., 2022]. Endüstriyel düzeyde kurutma veya radyasyon gibi fiziksel, mekanik veya dezenfektan kullanımı gibi kimyasal yöntemler biyofilmin olumsuz etkilerinden korunmayı sağlamaktadır [O'Toole et al., 2000].

Biyofilmi gidermede doğru dezenfektanın seçimi ve temizliğin sık gerçekleştirilmesi çok önemlidir [Rossi et al., 2022]. Klorlu bileşikler, hidrojen peroksit, perasetik asit ve kuarterner amonyum içeren temizleyiciler ile fırçalama, soyma, köpük oluşturma, su jeti veya vurgulu elektrik alanı gibi metotlar aracılığı ile oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması mümkün olabilmektedir [Kumar and Anand, 1998; Galié et al., 2018]. Kimyasal ajanların etkinliğini arttırmak amacıyla enzim kullanımı, EPS tabakanın parçalanmasını ve kimyasal ajanların biyofilm içerisine ulaşmasında yardımcıdır [Rossi et al., 2022].

Biyofilm mikroorganizmaların yüzeye ve/veya birbirlerine geri dönüşümsüz tutunarak oluşturdukları hareketsiz bir yaşam biçimidir. Hücreler biyofilm sistemi içerisinde fenotipleri değişmiş halde, oluşturdukları ekzopolisakkaritlere tutulu olarak yaşarlar ve serbest bulunan hücrelere kıyasla çevresel koşullara karşı daha dayanıklıdır. Bu nedenle biyofilm içerisindeki hücrelerin ortadan kaldırılması serbest halde bulunanlardan daha zordur. Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü'nün açıkladığı verilere göre enfeksiyon hastalıklarının %80'ine yakını biyofilm ilişkilidir [Lewis, 2001]. Bu nedenle biyofilm oluşumunun mekanizması, önlenmesi veya giderilmesi ile ilgili çalışmalar kiritik öneme sahiptir.

Bakterileri biyofilm oluşturma kapasitelerine göre değerlendirebilmek, belirli bir antibiyofilm ajanın etkinliğini incelemek, hedef mekanizmaları test edebilmek için bazı mikrobiyolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır.

2.3.6. Biyofilm oluşumunda yeter sayının algılaması (*quorum sensing*, QS) ve kontrolü

Biyofilm oluşumunda hücreler arası iletişim oldukça önemlidir. Kendi türünü veya yabancı türleri algılayabilmelerini sağlayan yeter sayı algılama (*quorum sensing* (QS)) molekülleri bakterilerin biyofilm oluşumunda sürecin yönlendirilmesini sağlar [Renner and Weibel, 2011]. Hücre sayısının artışı ile doğru orantılı artan QS sinyal molekülleri, mikrokolonilerin büyümesini ve komünitedeki hücrelerin organizasyonunu düzenler [Renner and Weibel, 2011].

QS, gen ekspresyonunun hücre popülasyonunun yoğunluğuna bağlı olarak düzenlenmesidir [Miller and Bassler, 2001]. Ortamda hücre yoğunluğunun belirli bir seviyeye gelmesi ile bakteri hücreleri tarafından otoindükleyici sinyal molekülleri üretilir [Miller and Bassler, 2001]. Bu olay eşik değerinin algılanması ile başlar ve gen ekspresyonunun buna bağlı değişmesi ile devam eder [Miller and Bassler, 2001]. Otoindükleyici moleküller; Gram pozitifler bakterilerde oligoproteinler, Gram negatiflerde ise homoserin laktonlar olmak üzere gruplandırılmışlardır ve bu moleküller sayesinde tür içi ve türler arası iletişim sağlanmaktadır [Miller and Bassler, 2001]. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler QS moleküllerini sentezleyerek fizyolojik aktivitelerini QS vasıtasıyla düzenlerler [Miller and Bassler, 2001]. Böylelikle bakteriler simbiyoz, virulans, kompetans, konjugasyon, antibiyotik üretimi, hareketlilik, sporulasyon, biyofilm oluşumu [Miller and Bassler, 2001] veya

biyoluminesans [Nealson, 1977] gibi önemli fizyolojik aktivitelerini gerçekleştirmede metabolizmalarını yönlendirebilirler. Tek hücreli canlılar olan bakterilerde komünite içerisinde hücrel organizasyonu sağlaması nedeni ile QS tek hücrelilikten çok hücreliliğe geçişin erken aşamalarından kabul edilmektedir [Miller and Bassler, 2001]. Fenotipik heterojeniteleri sayesinde klonal bakteri popülasyonları birbirini tamamlayan işlevler göstererek, ardışık, hızlı ve sık değişen çevresel faktörlerin üstesinden gelirler [Striednig and Hilbi, 2022]. QS, bakterilerin bu kolektif davranışlarını bireysel ve popülasyon heterojenitesini yönlendirerek organize eder, komünitenin uyumlu işlemlerini sağlar [Striednig and Hilbi, 2022].

QS için bazı bakteri türleri tek molekül kullanırken, birden çok molekül kullanan türler olduğu da bilinmektedir [Miller and Bassler, 2001]. Sadece sinyal molekülleri arası değil, aynı zamanda sinyalin diğer hücrelere ulaştırılması, elde edilen bilginin işlenmesi ve sinyallerin türler arası farklılaşması gibi aşamalarda da türler arasında çeşitlilik görülmektedir [Miller and Bassler, 2001].

QS mekanizmasına etki edebilen ajanların kullanımı ile bakteri suşlarının biyofilm oluşturmada rol oynayan genlerinin ekspresyonu etkilenmekte ve böylece biyofilm oluşumu engellenebilmektedir. Azitromisin [Tateda et al., 2001], furanil hidrazid [Persson et al., 2005], siklohegzanon [Smith et al., 2003] ve bromin furanon [Janssens et al., 2008] gibi sentetik ajanlar ile *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* gibi bakterilerde QS inhibisyonun sağlandığı çalışmalar mevcuttur. Bunlara ek olarak, sarımsak ekstraktı [Bodini et al., 2009], ananas ekstraktı [Musthafa et al., 2010], maviyemiş ekstraktı [Vattem et al., 2007], üzüm ekstraktı [Vattem et al., 2007] ve altıntop ekstraktı [Girennavar et al., 2008] gibi bitki ekstraktlarının *C. violaceum*, *A. tumefaciens* NTL4 suşu ve *P. aeruginosa* gibi bakterilere karşı QS inhibitörü olarak etkinlikleri belirlenmiştir.

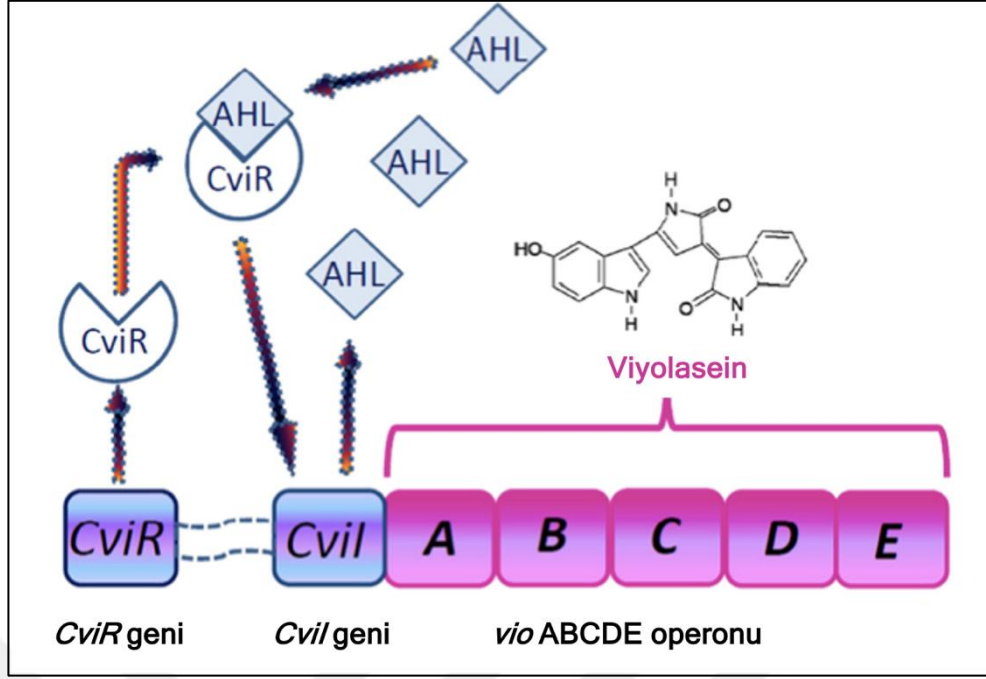
Enfeksiyon tedavisinde antibiyotiklerin sık ve kontrolsüz kullanımı ile artan antibiyotik direnci nedeniyle enfeksiyonların kontrolü zorlaşmaktadır [Moradi et al., 2020]. Enfeksiyonlu alanda biyofilm oluşumu bakterinin antibiyotik ajanlara dayanımında artışa neden olmaktadır [Keelara et al., 2016; Sepandj et al., 2007]. Bakteriyel enfeksiyon kontrolünde QS kontrolü alternatif bir mekanizmadır [Moradi et al., 2020]. QS moleküllerinin üretiminin ve difüzyonunu engellenmesi, oluşan molekülün yok edilmesi veya sinyal yapılarının taklit edilerek reseptörlerin blokajı gibi yollar hedeflenerek QS ilişkili enfeksiyon kontrolü sağlanabilmektedir

[Williams, 2007]. Antibakteriyel ajanlara dayanıklılık nedeni sorunların önüne geçmek amacıyla QS inhibisyonunu sağlamak amacıyla doğal biyoaktif ajanların etkinliği değerlendirilebilir. Fenolikler, terpenoidler, flavononlar ve kinonlar gibi biyoaktif özellikleri bulunan bileşiklerce zengin bitkilerin ekstraktları anti-QS aktivite elde etme amacıyla kullanılabilir. QS moleküllerine benzer kimyasal yapıda olmaları veya oluşan QS sinyal moleküllerini etkisiz hale getirebilmeleri ile bu amaç için uygun bileşikler olabilirler [Moradi et al., 2020].

Enfeksiyon kontrolünde bakteriyi öldürmeden patojenitesini azaltan veya durduran ve böylece virulansı sustururken [Vikram et al., 2010] bakterinin dayanıklılık geliştirmesini engelleyen [P. Truchado et al., 2009; Alvarez et al., 2012] moleküllere antipatojenik moleküller denir. QS inhibitörleri de antipatojenik ajanlara iyi bir örnektir. İnsan kullanımında toksik ve karsinojen olmaları nedeniyle sınırlamalar olan halojenli furanlar, bilinen en etkili QS inhibitörüdürler [Choo et al., 2006; Ioana Cotar, 2012].

2.3.7. Bir QS indikatörü olarak *Chromobacterium violaceum*, viyolasein üretimi ve kontrolü

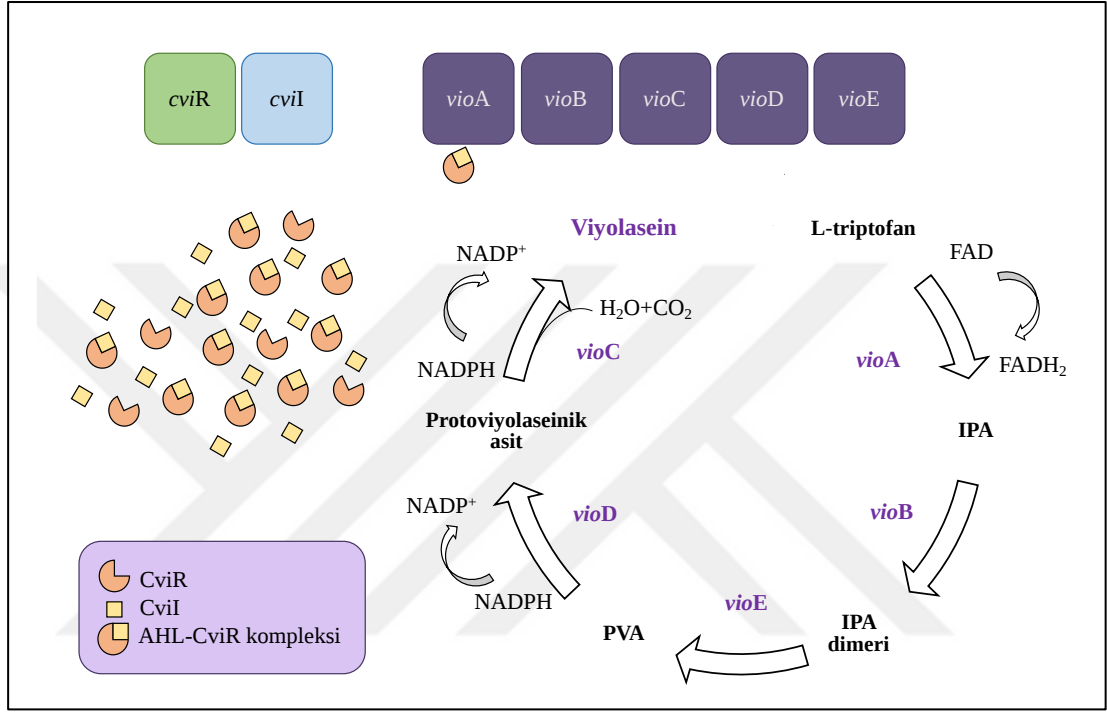
C. violaceum tek halkasal kromozomu bulunan 30-35 °C sıcaklıkta etkin üreyen, fakültatif anaerobik, subtropik bölgelerde bulunan toprak kökenli Gram negatif bir bakteridir [Choo et al., 2006; Kothari et al., 2017]. *C. violaceum* QS çalışmalarının önemli bir model organizmasıdır [Kothari et al., 2017]. İnsanlarda nadiren ölümcül seviyede enfeksiyona sebep olabilmektedir [Kothari et al., 2017]. *C. violaceum* çeşitli işlevleri olan, mavi-mor renkli, suda çözünemeyen bir pigment olan viyolaseini üretir [Lichstein and Van De Sand, 1945; Kothari et al., 2017]. *C. violaceum* bakterisinin ürettiği bu mor pigment viyolaseinin ekspresyonu, bakteride QS ile düzenlenen 7.3 kb uzunluğunda bir DNA parçasındaki *vio* operon (*vio* A-E) tarafından kodlanır [Kothari et al., 2017] (Şekil 2.3). Solunum ilişkili bir pigment olduğu düşünülen viyolasein, hücrede sekonder metabolit olarak üretilen bir biyoaktif moleküldür [Kothari et al., 2017].



Şekil 2.3: Viyolasein operonunun şematik gösterimi [Durán et al., 2016].

C. violaceum'da QS, evrimsel olarak korunmuş bitişik *CviI* ve *CviR* genleri tarafından transkribe edilen, transkripsiyon regülatörü olan moleküller tarafından sağlanır [Kothari et al., 2017]. Viyolasein'in üretimini ve diğer fenotiplerini düzenleyen genlerden *CviI*, otoindükleyici sentazdır; *CviR* ise reseptördür [de Vasconcelos et al., 2003]. *CviI*, otoindükleyici homoserin laktonun (6-HSL) üretilmesini sağlar. *CviR* ise DNA bağlanma sitoplazmik transkripsiyon faktörünün üretiminden sorumludur [Kothari et al., 2017]. Bu bitişik genlerin transkripsiyonu 73 bazçiftilik DNA'nın zıt zincirlerinden başlayarak gerçekleşir [de Vasconcelos et al., 2003]. Hücre yoğunluğunun artması ile artan 6-HSL konsantrasyonu, sitoplazmik *CviR* protein-ligand kompleksinin kalıcı bağlanması gerçekleşir [Kothari et al., 2017]. 6-HSL-*CviR* kompleksi *vio* operonun promotörüne bağlanır ve operonun transkripsiyonunu başlatır [Kothari et al., 2017]. İki molekül triptofanın oksidasyonu ile viyolasein biyosentezi başlar [Mizuno and Jezeski, 1961]. Yağ asitleri veya S-metionin, *CviI* tarafından 6-HSL'a dönüştürülür ve 6-HSL-*CviR* kompleksi oluşarak *vio* operonun tek yönlü transkripsiyonu başlatılır [Kothari et al., 2017]. Triptofan, *vioA* tarafından indol-3-pürivik asite (IPA) okside edilir [Kothari et al., 2017]. IPA, FAD kofaktörünü indirger ve kısa ömürlü imin dimerlerine dönüşür [Durán et al., 2016]. Kısa ömürlü dimerler *vioB* aktivitesi ile ya doğrudan kromopirolik aside, ya da *vioE* aktivitesi ile protodeoksiviyolaseinik aside (PVA) dönüştürülür [Kothari et al., 2017]. PVA

viyolasein biyosentezi için gerekli öncül moleküldür, bu nedenle *vioE*'nin viyolasein sentezinde anahtar yapı olduğu düşünülmektedir [Hirano et al., 2008]. PVA'nın indol halkasının 5. pozisyonundan *vioD* tarafından hidroksillenmesi ile proviyolasein üretilir [Ran et al., 2015]. Proviyolasein NADPH'nin oksidasyonu ile *vioC* tarafından viyolaseine dönüştürülür (Şekil 2.4) [Kothari et al., 2017].



Şekil 2.4: Viyolasein biyosentezi [Kothari et al. (2017)'dan düzenlenerek hazırlanmıştır].

Bakteriyel iletişimde ve patojenitede böylesine önemli bir sistem olan QS'in kontrolünde sentetik inhibitörlerin yanında alternatif ve doğal içerikli inhibitörlerin etkinliğini değerlendirmek önemlidir (Çizelge 2.5). Bu amaçla misvak bitkisinin (*Salvadora persica*) kök, yaprak ve gövde gibi kısımlarının metanolik ekstraktları [Noumi et al., 2017], vanilya (*Vanilla planifolia*) metanolik ekstraktı [Choo et al., 2006] *C. violaceum* ATCC 12472 ve *C. violaceum* CV026 suşlarına karşı kullanılmıştır. Misvak ekstraktları ile kalitatif testler sonucunda QS inhibisyonunun %13.21-70.32 oranlarındayken, kantitatif testler sonucunda ise %1.91-90.1 oranları arasında olduğu belirlenmiştir [Noumi et al., 2017]. Vanilya metanolik ekstraktı ile ise kantitatif testler sonucunda, QS inhibisyonunun %98.41 oranında olduğu

belirlenmiştir [Choo et al., 2006]. Bu çalışmalar ile QS kontrolünde doğal ajanların yüksek etkinlikte olduğu ortaya konulmuştur.

Çizelge 2.5: Bitkisel ekstraktların QS inhibisyonunda kullanımı [Khan et al., 2018].

Ekstraksiyonu yapılan bitki	Bitki Kısım	Biyosensör Suş	İnhibe Edilen Virulans Faktörü	Kaynak
<i>Punica granatum</i> (Nar)	Topraküstü kısımları	<i>P. aeruginosa</i>	Hareket, piyosiyanin, LasA proteaz	Elmanama and Al-Reefi (2017)
<i>Pistacia atlantica</i> (Atlantik sakızı)	Yaprak	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Piyosiyanin	Kordbacheh et al. (2017)
<i>Mangifera indica</i> (Mango)	Yaprak	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472 <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Elastaz, proteaz, piyosiyanin, EPS, kitinaz, yüzme, biyofilm	Husain et al. (2017)
<i>Punica granatum</i> (Nar)	Kabuk	<i>C. violaceum</i>	Viyolasein ve biyofilm	Yang et al. (2016)
<i>Capsicum annuum</i> (Biber)	Meyve	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	Viyolasein	Cosa et al. (2016)
<i>Acer monspessulanum</i> (Fransız akçaağacı)	Yaprak	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472 <i>C. violaceum</i> CV026 <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Viyolasein ve süzülme hareketi	Ceylan et al. (2016)
<i>Rubus rosaefolius</i> (Çilek ahududu)	Meyve	<i>C. violaceum</i> ATCC 6357	Viyolasein, biyofilm ve süzülme hareketi	Oliveira et al. (2016)
<i>Ficus carica</i> (İncir)	Yaprak	<i>C. violaceum</i> CV026 <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Viyolasein ve süzülme hareketi	Sun et al. (2015)

2.3.8. *Pseudomonas aeruginosa* ve piyosiyanin

P. aeruginosa özellikle solunum yolu ilişkili hastalıklarda fırsatçı patojen olarak enfeksiyona neden olan mikroorganizma olarak bilinmektedir [Steindler et al., 2009]. Yüksek virulansı nedeniyle enfekte bireylerin tedavisi zorlaşmaktadır. Las, Rhl ve Pqs gibi bazı quorum sensing sistemlerine sahiptir ve hücre yoğunluğuna dayalı birçok bakteriyel mekanizmayı bu sistemler ile kontrol eder [Barone et al., 2024].

LasI/R ilişkili quorum sensing sisteminde, otoindükleyici molekül N-(3-oxo-dodecanoyl)-homoserin laktondur (3-oxo-C12-HSL). *lasI*, 3-oxo-C12-HSL'un sentezini gerçekleştirir ve sentezlenen 3-oxo-C12-HSL'un LasR regülatörüne bağlanmasını takiben ilişkili gen ürünlerinin transkripsiyonu gerçekleşir.

RhlI/R ilişkili quorum sensing sisteminde, otoindükleyici molekül N-(butanoyl)-homoserin laktondur (C4-HSL) ve sentezini *rhlI* gerçekleştirir. Otoindükleyici molekül sentezlendikten sonra benzer şekilde RhlR regülatörüne bağlanır ve ilişkili gen ürünlerinin transkripsiyonu düzenlenir. Bu iki sistem birbiri ile yakından ve hiyerarşik olarak ilişkilidir. LasI/R sistemi *rhlI*/R genlerinin ekspresyonunu da düzenlemektedir [Steindler et al., 2009]. Pqs-MvfR *P. aeruginosa*'da quorum sensingi düzenleyen bir başka sistemdir. *pqs* ekspresyonu LasR bağımlı gerçekleşmektedir ve ekspresyonu arttıkça *rhlR* geninin ekspresyonu da artmaktadır [Sırıken ve Öz, 2017]. Bu sistemde homoserin lakton ailesine ait olmayan 2-heptil-3-hidroksi-4 (1H) kinolon ve öncülleri MvfR regülatörüne bağlanır ve ilgili genlerin ekspresyonunu kontrol eder [Kennedy et al., 2010]. *P. aeruginosa*'da elastaz, alkalın proteaz, egzotoksin A, ramnolipid, piyosiyanin ve biyofilm ile ilişkili genlerin ekspresyonundan sorumludur ve bu yaklaşık olarak *P. aeruginosa* genomunun %10'una tekabül etmektedir [Hentzer et al., 2003; Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2003].

Piyosiyanin *P. aeruginosa* tarafından üretilen, redoks ilişkili, mavi-yeşil renk veren bir sekonder metabolit ve önemli bir virulans faktörüdür. Hayvan ve insanlarda solunum yolu enfeksiyonunda virulansın şiddetini tahmin etmede önemli bir işaretçidir [Caldwell et al., 2009; Rode and Leto, 2013]. Piyosiyanin biyolojik zarlardan geçebilen ve bu esnada solunum prosesi esnasında açığa çıkan elektronları alıp taşıyabilen, fenazin türevi bir bileşiktir. Oksijenin kısıtlı olduğu ortamlarda redoks potansiyel gradiyenti oluşturarak biyofilm oluşumunda önemli bir etmen olan demirin biyoygunluğunu artırır. Hücre içi reaktif oksijen türlerini artırır ve enfekte ettiği

organizmalarda oksidatif strese, hücre döngüsünde, nükleik asitlerde bozulmaya neden olur. Bu nedenle sistik fibrozis gibi *P. aeruginosa* ilişkili enfeksiyonlarda piyosiyaninin inhibisyonunu hedefleyen moleküllerin belirlenmesi önemlidir.

2.4. Tarımsal atıkların önemi

Tarımsal üretim esnasında açığa çıkan meyve ve sebze atıkları tarımsal atık olarak adlandırılır ve genellikle gübre veya hayvan yemi olarak kullanılır [Naqvi et al., 2020]. Evde ve endüstriyel üretim esnasında gıda işleme ile çok büyük miktarda atık açığa çıkmaktadır [Naqvi et al., 2020]. Doğrudan atıldığında çevreye çeşitli yollardan zarar verebilmektedir. Bu yüzden güvenli ve verimli bir şekilde bertaraf edilmeli ve bu işlem sonunda çevreye fayda sağlanmış olmalıdır [Naqvi et al., 2020]. Atık olarak değerlendirilebilecek farklı bitki kısımları çeşitli biyoaktiviteleri olan bazı fitokimyasallar içerirler [Aref et al., 2010]. Gıda sanayinde kullanılan tarımsal ürünlerden artakalan tarımsal atıkların etkin kullanımı oldukça önemlidir. Bu atıkların değerlendirilmesi sayesinde biyoaktiviteleri olan çeşitli fenolik bileşikler, beslenmeye katkı sağlayacak protein hidrolizatları (aminoasitler), karbonhidratlar veya yağlar geri kazanılabilmektedir. Gıda artıklarının geri dönüşümü sonucu faydalı ürünlerin eldesi özellikle sürdürülebilir ürünler üretmeyi amaçlayan ülkeler için oldukça önemlidir [Seguí Gil and Fito Maupoey, 2018].

Tarımsal atıkların biyoaktivitesi yüksek bitkisel özütler elde etmede kullanımı bu amaca hizmet etmektedir. Bazı *in vitro* çalışmalarda etki spektrumları, mekanizmaları sıkça çalışılan fenolik bileşikler veya fenolik bileşiklerce zengin bitki özlerinin gıda uygulamalarının da gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir. Fenoliklerin antimikrobiyal etkinliğin yanında gıda temaslı yüzeylerde büyük sorunlara neden olan biyofilm oluşumunu kontrol altına alabilen antibiyofilm etki ve ilişkili diğer mekanizmaların araştırılması da oldukça önemlidir. Fenoliklerin ve mikroorganizmaların gıda içerisinde bulunan diğer içerikler ile etkileşime girmesi, fenoliklerin antimikrobiyal etkinliklerini düşürebilmektedir.

2.4.1. Fıstık (*Pistacia vera*) dış pembe kabuğu ve ekstraktlarının biyoaktiviteleri

Fıstık (*P. vera* L.) Orta-Batı Asya'nın kurak bölgelerinden kökenlenen yüksek değerli bir üründür. Türkiye, Dünya fıstık üretiminde ABD ve İran'dan sonra üçüncü

sıradadır. 2015-2018 verilerine göre Türkiye, dünya toplam üretiminin %15.46'sını gerçekleştirmektedir. 2018 yılı dünya üretiminin (1.450.600 ton) %16.54'ü ülkemizde gerçekleştirilmiştir [FAOSTAT, Erişim Tarihi: 2021]. Şanlıurfa, Gaziantep ve Siirt üretimin en yüksek miktarda gerçekleştiği illerdir. 2015-2018 yılı fıstık ithalat miktarı 15 ton (2.424.000 ABD doları) iken ihracat miktarı ise 15.347 tondur (235.400.000 ABD doları) [FAOSTAT, Erişim Tarihi: 2021].

Fıstık fenolik içeriği yüksek bir yemiştir. Bu nedenle işlevsel besin olarak adlandırılmıştır [Tomaino et al., 2010]. En yüksek antioksidan içeren ilk 50 gıda ürünü arasındadır [Halvorsen et al., 2006]. Fıstığın %60-70'i iç olarak tüketilirken, kalanı tatlı, kek, dondurma ve şekerleme üretiminde kullanılmaktadır [Kilic et al., 2016]. İşleme sonrası, fıstık dış kabuğu, yapraklar, dallar, artık iç ve sert odunsu kabuk açığa çıkmaktadır. Fıstık kabukları toplam fıstık işleme atıklarının %60'ını oluşturur [Mohammadi Moghaddam et al., 2009]. Türkiye'de endüstriyel işleme esnasında toplam üretimin %3'ünün atık kabuk olduğu belirlenmiştir. Bu atık, kontrolsüz bir şekilde doğaya atılmakta ve kirliliğe neden olmaktadır [Socas-Rodríguez et al., 2021].

Fıstık toplandıktan sonra 24 saat içinde işlenmelidir, kabuğun kapacağı nem ile ligninli kabuk boyanabilir [Seeram et al., 2006]. Kaliteyi olumsuz olarak etkileyecek bu durumu önlemek amacıyla dış pembe kabuğu hasattan sonra kısa süre içerisinde el ile veya özel makineler aracılığıyla ayıklanır. Ayıklanan fıstık dış pembe kabukları kullanılmadan atılır, bu durum çevresel problemlere yol açabilir [Arjeh et al., 2020]. Bazı bölgelerde fıstık dış pembe kabuğu hayvan yemi olarak değerlendirilse de bu durum hayvanlarda beslenme bozukluklarına neden olur. İçerdiği fenolik bileşikler ve taninler karbonhidrat, yağ ve proteinlerle etkileşime girerek besin olarak kullanılabilirliklerini azaltır [Mokhtarpour, 2014].

Fıstık dış pembe kabuğu biyoaktif bileşiklerce özellikle fenoliklerce zengin bir atık olarak bilinir [Goli et al., 2005]. Bu özelliğinden dolayı fıstık dış pembe kabuğunun bir biyoaktif bileşik kaynağı olarak kullanılması fıstık üretiminin değerlendirilmesine neden olduğu gibi yan ürün olarak kullanımının da önünü açar [Arjeh et al., 2020]. Fıstıkta fitosteroller, yağ asitleri, lutein, tokoferol ve diğer bazı polifenollerin varlığı birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir [Knekt et al., 2002; Liu, 2004; Phillips et al., 2005; X. Wu and Prior, 2005; USDA, 2012].

P. vera dış pembe kabuğu fitokimyasal içeriği belirlenmek üzere ayrıntılı çalışılmış bir tarımsal atıktır. Dondurarak [Oskoueian et al., 2020; Özbek et al., 2020], oda

sıcaklığında [Garavand et al., 2017; Sonmezdag et al., 2017] veya ısıya maruz bırakarak [Ozay et al., 2021] kurutulan fıstık dış kabuğu genellikle öğütüldükten sonra metanol ve etanol gibi alkol türlerinin saf halleri [Barreca et al., 2016] veya sulu çözeltileri [Sonmezdag et al., 2017; Ahmadi et al., 2018; Özbek et al., 2020; Gharibi et al., 2023], saf su [Garavand et al., 2017; Seifzadeh et al., 2019; Özbek et al., 2020;] veya metanol-hidroklorik asit kombinasyonu [Oskoueian et al., 2020] ile farklı miktarlarda karıştırılarak ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla oda sıcaklığında çalkalama [Barreca et al., 2016; Gharibi et al., 2023], mikrodalga aracılı ekstraksiyon (MAE) [Garavand et al., 2017; Özbek et al., 2020], ultrasonik homojenizasyon [Ahmadi et al., 2018] ve enzim destekli ekstraksiyon [Seifzadeh et al., 2019] gibi ön uygulamalar kullanılmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan çözeltilerin uçurulması genellikle döner buharlaştırıcı ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerin kombinasyonu ile gerçekleştirilen ilgili çalışmalara ait fitokimyasal içerik sonuçları Çizelge 2.6'da özetlenmiştir. Genel olarak incelendiğinde fıstık dış pembe kabuğunun gallik asit, kateşin, kuersetin, epikateşin, p-kumarik asit, kafeik asit, ellajik asit, epikateşin gibi fitokimyasallarca zengin olduğu söylenebilir.

Çizelge 2.6: *P. vera* dış kabuğu ekstraktları ile gerçekleştirilen fitokimyasal içerik belirleme çalışmaları.

Materyal	Hazırlık	Karıştırma oranı ve çözücü	Ekstraksiyon yöntemi	İçerik	Kaynak
Olgun <i>P. vera</i> L. var. Bronte dış kabuğu	Soğukta muhafaza (-20 °C) ve öğütme (3.0 g)	3 g:19.5 mL metanol ve etanol	Oda sıcaklığında 12 saat karıştırma ve döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Metanol Gallik asit: 57.20 ± 3.869 µg/g YA Kuersetin: 0.77 ± 0.01µg/g YA Kateşin: 60.64 ± 1.38 µg/g YA Epikateşin: 0.88 ± 0.05 µg/g YA Etanol Gallik asit: 14.50 ± 0.62 µg/g YA Kuersetin: n.d. µg/g YA Kateşin: 31.64 ± 4.53 µg/g YA Epikateşin: 0.37 ± 0.01 µg/g YA	Barreca et al. (2016)
<i>P. vera</i> L. var. Kalleguchi dış kabuğu	Elde ayıklama, açık havada kurutma (30 °C)	10 g:500 mL Saf su	Oda sıcaklığında 2 saat çalkalama ve MAE (Mikrodalga aracılı ekstraksiyon ekstraksiyon) işlemine tabi tutma	p-kumarik asit: 13.9 ± 2.2 µg/g KA Kateşin: 53.6 ± 3.5 µg/g KA	Garavand et al. (2017)
Olgun <i>P. vera</i> L. var. Uzun ve Ohadi dış kabuğu	Oda sıcaklığında (20-25°C) kurutma ve öğütme	5 g:25 mL %75 (s/s) metanol	2 saat boyunca karıştırma ve buharlaştırma	Uzun Gallik asit: 5505.33 ± 236.72 µg/kg Kateşin: 1920.65 ± 32.65 µg/kg Epikateşin: 22.59 ± 0.67 µg/kg Kuersetin: 169.44 ± 6.94 µg/kg Ohadi Gallik asit: 4994.41 ± 214.75 µg/kg Kateşin: 1892.46 ± 32.17 µg/kg Epikateşin: 16.42 ± 0.49 µg/kg Kuersetin: 169.34 ± 6.94 µg/kg	Sonmezdag et al. (2017)
<i>P. vera</i> L. var. Ohadi dış kabuğu	Fırında kurutma (45 °C)	10 g:150 mL Saf su	40°C'de döner buharlaştırıcı ile çözücünün uzaklaştırma	Gallik asit: 5.22 ± 0.21 mg/g ekstrakt tozu Kateşin: 0.04 ± 0.41 mg/g ekstrakt tozu	Lalegani et al. (2018)

Çizelge 2.6: *P. vera* dış kabuğu ekstraktları ile gerçekleştirilen fitokimyasal içerik belirleme çalışmaları (devam).

Materyal	Hazırlık	Karıştırma oranı ve çözücü	Ekstraksiyon yöntemi	İçerik	Kaynak
<i>P. vera</i> L. var. Bronte dış kabuğu	Kurutma, öğütme, eleme	25 g:500 mL saf su	Oda sıcaklığında 8 saat boyunca karıştırma, santrifüj ve dondurarak kurutma	Kateşin: 1.20 ± 0.02 g/kg	Fattahifar et al. (2018)
İran'ın farklı lokasyonlarından <i>P. vera</i> L. h dış kabukları (Jangal, Fayzabad, Rafsanjan)	Sıvı nitrojende fıstıkları (100 g) bekletme (20 saniye), elde ayıklama	1.5 g:10 mL Metanol:su (2/1 (s/s))	Oda sıcaklığında ultrasonik homojenizasyon işlemi ve döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştıma	Jangal Kateşin: 71.5 ± 1.5 µg/g KA	Ahmadi et al. (2018)
				Fayzabad Kateşin: 48.5 ± 1.4 µg/g KA	
				Rafsanjan Kateşin: 45.9 ± 1.3 µg/g KA	
<i>P. vera</i> L. var. Ahmadaghaei dış kabuğu	Fırında kurutma (40 °C), öğütme, eleme (0.5–2 mm partikül büyüklüğü)	1 g:15 mL saf su	Oda sıcaklığında 8 saat inkübasyon, pektinaz enzimi ile muamele ve çalkalamalı inkübasyon (50°C'de 120 rpm'de 30 dakika)	Kaffeik asit-O-hegzosid: 0.41 ± 0.15 mg/g KA Gallik asit: 17.62 ± 0.18 mg/g KA Ellajik asit: kalitatif	Seifzadeh et al. (2019)
<i>P. vera</i> L. dış kabuğu	Isı aracılı kurutma (50 °C, 1 gün)	5 g:50 mL, su	Farklı sıcaklıklara maruz bırakma (25, 50, 75 °C)	Kumarik asit: 2.993 µg/L	Ozay et al. (2021)

Çizelge 2.6: *P. vera* dış kabuğu ile gerçekleştirilen fitokimyasal içerik belirleme çalışmaları (devam).

Materyal	Hazırlık	Karıştırma oranı ve çözücü	Ekstraksiyon yöntemi	İçerik	Kaynak
Olgun ve taze <i>P. vera</i> L. var. Owhadi meyvelerinin dış kabuğu	Dondurarak kurutma, öğütme	100 g:1000 mL %80 (s/s) metanol:6M HCl (800:200 (s/s))	Geri akış işlemine tabi tutma (90°C, 2 saat), döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma (40°C)	Gallik asit: 1750.218 µg/L Kafeik asit: 2.228 µg/L	Oskoueian et al. (2020)
Gaziantep çevresinden toplanmış <i>P. vera</i> dış kabuğu	Dondurarak kurutma	1.5 g:15 mL Etanol, etanol:su, su	MAE (125 W, 3 dakika) döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma (40°C), dondurularak kurutma	50:50 (s/s) etanol:su ekstraktı (-)-epiketeşin: 873 ± 27 µg/g p-kumarik asit: 52 ± 2 µg/g Quercetin 41 ± 1 µg/g Kaffeik asit: 36 ± 2 µg/g Gallik asit: 9340 ± 341 µg/g	Özbek et al. (2020)
<i>P. vera</i> L. var. Akbari, Kaleghouchi, Fandoghi ve Ahmadaghaei dış kabukları	Gölgede kurutma (25 °C 7 gün)	%80 (s/s) metanol	Çalkalamalı inkübasyon (oda sıcaklığında, 24 saat, 150 rpm)	Gallik asit: 27.89–45.25 mg/100 g Kateşin: 7.2–11.01 mg/100 g Epikateşin: 2.69 ± 4.98 mg/100 g Kuersetin: 0.32-0.62 mg/100 g	Gharibi et al. (2023)

Fıstık veya dış kabuğu gibi kısımları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların çoğu antimikrobiyal etki belirleme üzerine testleri içermektedir (Çizelge 2.7). Fıstık bitkisinin yaprak, dal, gövde, çekirdek ve tohum gibi kısımlarının kullanıldığı bir çalışmada 15 lipofilik ekstrakt elde edilmiş ve bu ekstraktların antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa*, *E. faecalis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı belirlenen MİK değerleri 128-256 mg/mL arasında olduğu görülmüştür [Özçelik et al., 2005]. Fıstık yeşil dış kabuklarından elde edilen ham ve saflaştırılmış ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör etkileri incelenen bir başka çalışmada, en yüksek antimikrobiyal etkinin su ekstraktı ile Gram pozitif bakterilere karşı olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon zon çaplarına göre incelenen test bakterileri arasında en hassas bakterilerin *B. cereus* (12 mm, 12.6 mm) *S. aureus* (11.7 ve 11.6 mm) olduğu görülmüştür [Rajaei et al., 2010]. Tunus'un farklı bölgelerinden hasat edilen fıstıkların dış kabuk ekstraktları ile *L. monocytogenes* ve *S. enterica*'ya karşı antimikrobiyal etkinlik çalışması gerçekleştirilmiş ve su ekstraktları ile test bakterileri üzerinde en yüksek antimikrobiyal etkinin elde edildiği görülmüştür [Elhadeb et al., 2021]. Bir başka çalışmada Gram pozitif (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. pyrogenes*) ve Gram negatif (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*) bazı bakteriler üzerinde fıstık ekstraktlarının etkisi incelenmiş ve ekstraktın yalnızca Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu görülmüştür [Bagheri et al., 2019]. Birçok farklı yöntemle elde edilen fıstık veya fıstık kabuğu ekstraktlarının, Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirildiğinde, fıstık kabuğu ekstraktının çoğunlukla Gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 2.7: *P. vera* kısımları ile gerçekleştirilen antimikrobiyal etki belirleme çalışmaları.

Bakteri Türü	Materyal	Ekstraksiyon Çözültisi	Yöntem	Etki	Kaynak
<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	Yaprak, dal, gövde, çekirdek, tohum	n-hegzan	MİK	128-256 mg/mL	Özçelik et al. (2005)
<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	Yeşil kabukları	Su, etanol, aseton, metanol, etil asetat, 2-propanol, metanol/su (70/30), etanol/su (70/30), metanol/su/asetik asit (70/30/1), etanol/su/asetik asit (70/30/1)	Agar difüzyonu	Gram pozitiflerde etkili	Rajaei et al. (2010)
<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i>	Tunus'un 3 farklı bölgesinden toplanmış fındık kabukları	N-hegzan, aseton, asetonitril, su	Agar difüzyonu, MİK	En etkin ekstrakt su ekstraktı, İnhibisyon zon çapı (mm): <i>S.</i> <i>aureus</i> :18.66, <i>L. monocytogenes</i> :17.25 ve <i>B.</i> <i>cereus</i> :16.25	Elhadeh et al. (2021)
<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Kabuk	Su, metanol, su ve metanol (1/1, s/s)	Disk difüzyonu, MİK, MBK	Gram pozitiflerde etkili, en etkin ekstrakt su ekstraktı	Bagheri et al. (2019)
<i>S. mutans</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>E. faecalis</i>	Tohum	Etanol (%80, s/s)	Agar difüzyonu	<i>S. mutans</i> , <i>A. viscosus</i> 'da etki var <i>E. faecalis</i> 'te yok	Salari Sedigh et al. (2021)

Antimikrobiyal açıdan farklı çalışmalarda kısmen değerlendirilen fıstık dış kabuğu, antibiyofilm etkinliği açısından henüz herhangi bir çalışmada hammadde olarak kullanılmamıştır. Bir çalışmada, *P. vera* bitkisinin gövdesinden elde edilen bir ekstrakt kullanılarak *P. aeruginosa* PAO1 bakterisinin oluşturduğu biyofilmi önlemede %92 oranında başarılı olunmuştur [Kordbacheh et al., 2017]. *Pistacia* cinsi üyeleri arasından *P. atlantica*'nın farklı kısımlarının kullanıldığı bazı çalışmalar mevcuttur [Magi et al., 2018; Darakhshandeh-Ghahfarokhi et al., 2021] (Çizelge 2.8). Literatürde tarımsal atıklarla antibiyofilm çalışmalarının nadir bulunması ve bu çalışmada da ayrıntılı olarak biyofilm mekanizmasına fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının etkisinin incelenmesi oldukça önemlidir.



Çizelge 2.8: *Pistacia* sp. kısımları ile gerçekleştirilen antibiyofilm etki belirleme çalışmaları.

Materyal	Karıştırma oranı (katı/sıvı)	Çözelti ve Ekstraksiyon Yöntemi	Test Bakterisi	Sonuç	Kaynak
<i>P. atlantica</i> ssp. <i>kurdica</i> bitkisinin yaprakları	20 g/300 mL	Metanol, oda sıcaklığında maserasyon, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma (40 °C)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (1.0 ve 2.0 mg/mL konsantrasyonlarda ekstrakt)	1.0 ve 2.0 mg/mL konsantrasyonlarda metanol ekstraktları ile %92 ve %79 biyofilm inhibisyonu	Kordbacheh et al. (2017)
<i>P. vera</i> bitkisinin gövdesi	21 g (çözücü hacmi belirtilmemiş)	Su, Clevenger cihazı ile hidrodistilasyon (3 saat)	<i>Streptococcus epidermidis</i> ATCC 35984	İnhibisyon yok	Magi et al. (2018)
			<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	%49.4 oranına kadar inhibisyon	
			<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	%71.2 oranına kadar inhibisyon	

Çizelge 2.8: *Pistacia* sp. kısımları ile gerçekleştirilen antibiyofilm etki belirleme çalışmaları (devam).

Materyal	Karıştırma Oranı (katı/sıvı)	Çözelti ve Ekstraksiyon Yöntemi	Test Bakterisi	Sonuç	Kaynak
<i>P. atlantica</i> bitkisinin yaprakları, meyveleri ve gal kısmı	Çalışmada belirtilmemiş	Aseton ve su,	<i>S. aureus</i>	Aseton	Meyve: %100
		Soxhlex cihazı ile ekstraksiyon (5-6 saat süren)		(12.5 mg/mL ekstrakt)	Yaprak: %100
					Gal: %100
				Su	Meyve: %75-80
				(12.5 mg/mL ekstrakt)	Yaprak: %0
					Gal: %80
			<i>P. aeruginosa</i>	Aseton ve su ekstraktlarında (12.5 mg/mL ekstrakt) tüm uygulamalar %100 inhibisyon	

P. vera kabuğunun diğer biyofilm ilişkili mekanizmalarda olduğu gibi QS etkinliği de çalışılmamıştır. Bilgimiz dahilinde, sadece bir çalışmada, *Pistacia* cinsinin bir üyesi olan *P. terebinthus* bitkisinin sap, yaprak ve tohumları kullanılarak bir metanol ekstraktı elde edilmiş ve bu ekstrakt yenilebilir kitosan film eldesinde kullanılmıştır (Çizelge 2.9). Ekstraktlı kitosan filmlerin viyolasein inhibisyonuna etkisi kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilerek etkili olduğu rapor edilmiştir [Kaya et al., 2018].

Çizelge 2.9: *Pistacia* sp. üyesi *P. terebinthus* kısımları ile *C. violaceum* CV026 bakterisinde viyolasein inhibisyonu.

Materyal	Ekstraksiyon yöntemi	Test bakterisi	Test Yöntemi	Sonuç	Kaynak
<i>P. terebinthus</i> tohum, yaprak ve sap ekstraktları ile karıştırılarak elde edilen yenilebilir kitosan filmler	Öğütme, ultrasonik aracılı metanol ekstraksiyonu, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	<i>C. violaceum</i> CV026	Disk difüzyonu Kantitatif	İnhibisyon zon çapı: 8.11-29.38 mm %28.13-89.34	Kaya et al. (2018)

P. aeruginosa PAO1 bakterisinin ürettiği piyosiyenin pigmenti önemli bir biyofilm ilişkili özelliktir. Bu nedenle, bu pigmentin miktarında azalmaya neden olan ajanların biyofilm kontrolünde kullanım potansiyellerini değerlendirmek oldukça önemlidir. *P. vera* dış kabuğu ile gerçekleştirilmiş piyosiyenin inhibisyonu çalışması bulunmamaktadır. Alternatif olarak, *Pistacia* cinsine üye *Pistacia lentiscus* bitkisinin yaprakları kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada piyosiyenin üretiminin %82 oranında kontrol altına alınabildiği rapor edilmiştir [Tahrioui et al., 2020] (Çizelge 2.10). *P. vera* pembe dış kabuğu ile piyosiyenin inhibisyonu çalışmalarının bulunmaması bu tez çalışmasını bu yönüyle de önemli kılmaktadır.

Çizelge 2.10: *Pistacia* sp. üyeleri ile *P. aeruginosa* PAO1 bakterisinde piyosiyanin inhibisyonu.

Materyal	Karıştırma oranı (katı/sıvı) ve çözelti	Ekstraksiyon Yöntemi	Sonuç	Kaynak
<i>P. lentiscus</i> L. bitkisinin meyveleri	8.98 g/120 mL Siklohegzan Etil asetat Metanol Su	Basınçlı solvent ekstraksiyonu (100 bar, 50 °C)	Siklohegzan ekstraktı (PLFE1) Etil asetat ekstraktı (PLFE2)	%82 oranında inhibisyon %50 oranında inhibisyon Tahrioui et al. (2020)

Biyofilm ilişkili bir özellik olarak değerlendirilen bakteriyel hareketin *P. vera* dış pembe kabuğu ekstraktları arcılığıyla kontrolü henüz çalışılmamış bir konudur. Diğer *Pistacia* türleri ile de çalışılmamış bu konuya örnek olabilecek fıstığın da üyesi olduğu *Anacardiaceae* familyasının sumak (*Rhus coriaria*) [Ahmed et al., 2022] ve mango (*Magnifera indica*) [Husain et al., 2017] gibi bitkilerden elde edilen ekstraktların kullanılması ile (Çizelge 2.11) her iki bitki ekstraktı ile %76.4-85 oranlarında bakteriyel süzülme ve yüzme hareketinde inhibisyonun sağlandığı rapor edilmiştir.

Çizelge 2.11: *Anacardiaceae* familyasının bazı üyelerinden elde edilen ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 bakterisinde piyosiyanın inhibisyonu, viyolasein inhibisyonu ve bu ekstraktların bakteriyel hareketin inhibisyonuna etkisi.

Anacardiaceae üyesi	Materyal	Ekstraksiyon yöntemi	Ekstraksiyon çözeltisi	Test mikroorganizması	Test edilen mekanizma	Sonuç	Kaynak	
<i>Rhus coriaria</i> (Sumak)	Meyve	Sonikasyon aracılı ekstraksiyon ve döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	n-hegzan	25 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatu	Piyosiyanin inhibisyonu	Su ekstraktı ile %88.5	Ahmed et al. (2022)	
			Kloroform					
			Etil asetat					
			n-bütanol		Süzülme hareketi inhibisyonu	Su ekstraktı ile %85		
			Etanol					
			Su					Yüzme inhibisyonu
<i>Mangifera indica</i> L. (Mango)	Yaprak	Çalkalamalı inkübasyon (5 gün, 500 g mango yaprağı tozu ve 2.5 L petrol eter karışımı)	Ekstraksiyon: petrol eteri <i>Fraksiyonlama:</i>	Benzen	Piyosiyanin inhibisyonu	Metanol fraksiyonu ile % 88.9	Husain et al. (2017)	
				Etil asetat	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Süzülme hareketi inhibisyonu		Metanol fraksiyonu ile %74.6
				Aseton		Biyofilm inhibisyonu		Metanol fraksiyonu ile %72.4
				Metanol	<i>C. violaceum</i> (CV026)	Viyolasein inhibisyonu		Metanol fraksiyonu ile %83.6
				Etanol				

2.4.2. Ananas (*Ananas comosus*) kabuğu ve ekstraktlarının biyoaktiviteleri

Bromeliaceae familyasının bir üyesi olan *Ananas comosus*, dünyadaki en popüler tropik meyvelerdendir. Anavatanı Güney Amerika olan ananasın Güney Brezilya, Güney Doğu Brezilya ve Uruguay'da doğal olarak yetiştiği bilinmektedir [Crestani et al., 2010], Kosta Rika, Brezilya ve Filipinler dünya toplam ananas üretiminin üçte birinden sorumludur [Martins et al., 2014; Dossa and Fuchs 2017]. Ananas gıda endüstrisinde meyve suyu konsantresi, reçel, şekerleme, esans ve turşu üretmek üzere çokça kullanılmaktadır [Chaurasiya and Umesh Hebbar, 2013]. Tüm meyvenin yaklaşık %25'i pazarlanabilirken, kabuk, yaprak, taç gibi kısımları ise ya kompost olarak kullanılır ya da değerlendirilmeden atılır [Crestani et al., 2010]. Bu durum, kıymetli bileşikler içeren ananas atığının ekonomik potansiyelini kaybetmesine neden olur [Crestani et al., 2010]. Bu tip tarımsal atıkların doğru değerlendirilmemesi büyük bir problemdir çünkü yanlış uygulama mikrobiyal kirliliğe neden olmaktadır. Ananas içeren ürünlerin artan üretimi ile yüksek miktarda ananas atığı açığa çıkmaktadır. Muamele edilmeden bertaraf edilmesi ile çeşitli çevresel sorunlara neden olabilecek bir atıktır. Bu nedenle ananas, çevresel sorunları azaltmak ve içerdiği şeker, fenolik bileşikler ve organik asitler gibi ürünleri değerlendirmek amacıyla ileri endüstriyel işlemlerde kullanılabilecek değerli bir hammaddedir. 2019-2021 yılları arasında yurtdışından ülkemize yaklaşık 80 bin ton ananas ithal edilmiştir [FAOSTAT, Erişim tarihi:19.11.2023]. İthal edilen ananaslar genellikle meyvesuyu veya sirke üretiminde kullanılmakta veya işlenmeden doğrudan satılmaktadır. Her durumda da çok miktarda atık açığa çıkmaktadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasının ananas kabuğunun kullanım potansiyelini değerlendirmek adına önemi artmaktadır.

Ananas kabuğunun kullanım alanlarını belirleyebilmek adına fitokimyasal içeriğinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla etanol [Gunwantrao et al., 2016; Namrata et al., 2017; Dabesor et al., 2017; Olakunle et al., 2019; Gani Soulissa et al., 2021; Zhou et al., 2023], metanol [Poadang et al., 2017; Dabesor et al., 2017; Olakunle et al., 2019] ve n-hegzanın [Owoeye et al., 2022] ananas kabuğu ekstraktı elde etmede ekstraksiyon çözeltileri olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Çizelge 2.12). Çoğunlukla maserasyon yöntemi ile ekstraksiyonun gerçekleştirildiği bu çalışmalarda döner buharlaştırıcı aracılığı ile ekstraksiyon çözeltileri uzaklaştırılmış ve ekstrakt farklı seviyelerde konsantre edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ananas kabuğunda

alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tannin, oksalat, fitat, glikozid, terpenoid, inülin, indirgenabilir şeker ve protein varlığı tespit edilmiştir [Gunwantrao et al., 2016; Poadang et al., 2017; Dabesor et al., 2017; Namrata et al., 2017; Olakunle et al., 2019; Gani Soulissa et al., 2021; Owoeye et al., 2022; Zhou et al., 2023].

Çizelge 2.12: Farklı yöntemlerle elde edilen ananas kabuğu ekstaktlarının fitokimyasal içerikleri (TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam flavonoid içeriği, GAE: Gallik asit eşdeğeri, RE: Rutin eşdeğeri, BSA: Bovin serum albümin eşdeğeri).

Önhazırlık	Ekstraksiyon yöntemi	İçerik	Kaynak
500 g kurutulmuş ananas kabuğu ve %96 (s/s) etanol	Maserasyon, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Alkaloid, flavonoid ve saponin	Gani Soulissa et al. (2021)
%98 etanol (s/s) veya su ile oda sıcaklığında kurutulmuş ananas kabuklarını 2/10 (k/s) oranında karıştırma	Maserasyon, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Alkaloid, oksalat, tannin, fitat, glikosid	Dabesor et al. (2017)
Fırında kurutma (60 °C), %60 (s/s) etanol ile 1/1 (k/s) oranında karıştırma, 50 °C ısı muamelesi ile 1.5 saat karıştırma	Etil asetat ile çöktürme, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma, dondurarak kurutma	Protokateşik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kuersetin, p-kumarik asit, ferulik asit	Zhou et al. (2023)
Dondurarak kurutma, metanol veya etanol (100 mL) ile 1/10 (k/s) oranında karıştırma ve kaynatma (30 dk)	Müslin kumaş ve Whatmann No.1 kağıt ile süzme, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	TPC: MetOH:7.98 mg/g EtOH: 11.1 mg/g TFC: MetOH:2.37 mg/g EtOH: 3.86 mg/g	Jatav et al. (2022)
Oda sıcaklığında kurutma (25 g), metanol veya etanol (250 mL) (1/10, k/s) ile 24 saat muamele etme	Döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Etanol ekstraktı: Alkaloid, tannin, saponin Metanol ekstraktı: Alkaloid, flavonoid, terpenoid	Gunwantrao et al. (2016)

Çizelge 2.12: Farklı yöntemlerle elde edilen ananas kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içerikleri (devamı) (TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam flavonoid içeriği, GAE: Gallik asit eşdeğeri, RE: Rutin eşdeğeri, BSA: Bovin serum albümin eşdeğeri).

Önhazırlık	Ekstraksiyon yöntemi	İçerik	Kaynak
100 g kurutulmuş ananas kabuğu ve 100 mL çözücüyü (1/1, k/s) (etanol veya soğuk su) karıştırma	Müslin kumaş ve Whatmann No.1 filtre kağıdı ile süzme, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Etanol ekstraktı: Kardiyak glikozid, flavonoid, alkaloid, Su ekstraktı: Tannin, kardiyak glikozid, alkaloid	Olakunle et al. (2019)
30 g yaş ananas kabuğu ve 600 mL ultrasaf su karışımı (1/20, k/s) öğütücü ile bulamaç haline getirme	Santrifüj, Whatmann No.1 filtre kağıdı ile süzme	TPC:4.21 mg GAE/g ekstrakt TFC:1.35 mg RE/g ekstrakt Şeker: 23.64 mg/g Protein: 1.26 mg BSAE/g ekstrakt	Poadang et al. (2017)
70 g kurutulmuş ananas kabuğu ve n-hegzan karışımını Soxhlet aracılı ekstraksiyona tabi tutma	Konsantre etmek amacıyla döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Alkaloid, fenol, tannin, flavonoid, saponin, karbonhidrat	Owoeye et al. (2022)
10 g kurutulmuş ananas kabuğu ve 100 mL etanol karışımı (1/10, k/s)	Kaynatma (30 dakika)	Tannin, flavonoid, Terpenoid, İnülin, Glikozid, Alkaloid, Fenolik bileşik	Namrata et al. (2017)

Fitokimyasal açıdan zengin olduğu birçok çalışmacı tarafından rapor edilen ananas kabuğunun bu tez çalışmasında kullanılma nedeni ile paralel olarak antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi oldukça önemlidir. Fıstık kabuğu ile yapılan çalışmalar kadar kapsamlı olmasa da literatürde temel mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak (agar kuyu difüzyonu, seri dilüsyon, MİK ve MBK belirlenmesi gibi) ananas kabuğunun

antimikrobiyal etkinliğinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır (izelge 2.13). *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus* (MRSA dahil), *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *V. cholerae* gibi önemli patojen bakterilere karşı etkinliği test edilen ananas kabuğu ekstraktının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin büyümelerini kontrol etmede etkili bir materyal olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [Dabesor et al., 2017; Lubaina et al., 2019; Jatav and Bhattacharya, 2022; Husniah and Tri Umiana Soleha, 2023; Zhou et al., 2023].



Çizelge 2.13: Farklı yöntemlerle elde edilmiş ananas kabuğu ekstraktlarının çeşitli patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri.

Ekstraksiyon yöntemi	Test Bakterisi	Yöntem	Sonuç	Kaynak
Dondurarak kurutma, 1/10 (k/s) oranında 100 mL çözücü ile karıştırma (metanol, etanol), kaynatma (30 dakika) müslin kumaş ve Whatmann No.1 filtre kağıdı ile süzme, döner buharlaştırıcı ile çözücüyu uzaklaştırma	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	Agar kuyu difüzyonu, MİK, MBK	Metanol ekstraktı: İnhibisyon zon çapı: 11-16 mm MİK:0.62-20 mg/g MBK: 0.62-20 Etanol ekstraktı: İnhibisyon zon çapı: 11-21 mm MİK:1.25-40 mg/g MBK:1.25-40 mg/g	Jatav et al. (2022)
Oda sıcaklığında kurutma, 2/10 (k/s) oranında çözücü (%98 etanol, su) ile karıştırma	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	Agar kuyu difüzyonu	Etanol ekstraktı: İnhibisyon zon çapı:12-15 mm Su ekstraktı: İnhibisyon zon çapı:12-14 mm	Dabesor et al. (2017)
Fırında kurutma (60 °C), %60 (s/s) etanol ile 1/1(k/s) oranında karıştırma, 50 °C ısı muamelesi ile 1.5 saat karıştırma, etil asetat çöktürmesi, döner buharlaştırıcı ile çözücüyu uzaklaştırma, dondurarak kurutma	İzole edilmiş bazı toprak bakterileri	Seri dilüsyon	%100 inhibisyon	Zhou et al. (2023)
Gölgede kurutma, 250 g kurutulmuş kabuk ve 100 mL çözücü (petrol eteri, etik asetat, etanol, su) ile karıştırma (2.5/1, k/s), Soxhlet aracılı ekstraksiyon, döner buharlaştırıcı ile çözücüyu uzaklaştırma	<i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Vibrio cholerae</i> MCV09, <i>K. pneumoniae</i> 700603	Agar kuyu difüzyonu	Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili En yüksek zon çapı 20 mm	Lubaina et al. (2019)
Öğütülmüş yaş kabuk (500 g) ve etanolü (500 mL, %96, s/s) karıştırma (1/1, k/s), çalkalamalı inkübasyona tabi tutma (24 saat, 120 rpm), döner buharlaştırıcı ile tamamen kurutma	Metisiline dayanıklı <i>S. aureus</i> suşları	MİK, MBK	MİK: %50 ekstrakt uygulaması MBK: %100 ekstrakt uygulaması	Husniah and Tri Umiana Soleha (2023)

En az antimikrobiyal etkinlik kadar önemli olan antibiyofilm etkinlik açısından ananas kabuğu ekstraktının incelenmesi ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur (Çizelge 2.14). Bu çalışmalar kapsamında biyofilm kontrolünde *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *P. aeruginosa* gibi patojenlere karşı ananas kabuğu ekstraktlarının etkinliğini incelenmiş ve farklı seviyelerde biyofilm kontrolü sağladığı belirlenmiştir [Musthafa et al., 2010; Gani Soulissa et al., 2021].

Çizelge 2.14: Farklı yöntemlerle elde edilmiş ananas kabuğu ekstraktlarının çeşitli patojen bakterilere karşı antibiyofilm etkilerini inceleyen çalışmalar.

Ekstraksiyon yöntemi	Yöntem	Test Bakterisi	Sonuç	Kaynak
Kurutulmuş ananas kabuğu (500 g) ve çözücü (%96 (s/s) etanol) karışımı, döner buharlaştırıcı ile çözücüyü uzaklaştırma	Oluşan biyofilmin giderilmesi	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	%25-100 ekstrakt uygulaması ile biyofilm giderme	Gani Soulissa et al. (2021)
		<i>F. nucleatum</i>	%100 ekstrakt uygulaması ile biyofilm giderme	
		<i>T. denticola</i>	%25 ekstrakt uygulaması ile biyofilm giderme	
Ananas meyvesi (10 g) ve saf suyu (50 mL) karıştırma (1/5, k/s), santrifüj (4000 rpm 10 dakika), üst sıvıyı 0.22 µm por çaplı steril filtre ile süzme	Biyofilm önleme	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	%90.37 inhibisyon	Musthafa et al. (2010)

Birçok farklı türe ait bitki kısımlarından elde edilen ekstraktlar kullanılarak anti-QS etki çalışmaları bulunsa da *Bromeliaceae* familyası üyesi olan diğer bitkiler ile veya

A. comosus ile yapılmış yalnızca bir adet çalışma mevcuttur (Çizelge 2.15). Bu çalışma ile ananas meyvesinden elde edilen ekstrakt ile *C. violaceum* ATCC 12472 ve *C. violaceum* CV026 suşlarında viyolasein inhibisyonunun sağlandığı ve ananas meyvesinin QS inhibisyonunda etkili bir materyal olduğu rapor edilmiştir [Musthafa et al., 2010]. Ayrıca, aynı ekstraktın *P. aeruginosa* PAO1 suşunun piyosiyanın üretimini de inhibe ettiği gösterilmiştir.

Çizelge 2.15: Ananas meyvesi ekstraktı ile *C. violaceum* CV026 bakterisinde viyolasein ve *P. aeruginosa* PAO1 suşunda piyosiyanın inhibisyonu ile ilgili çalışma.

Ekstraksiyon yöntemi	Yöntem	Test Bakterisi	Sonuç	Kaynak
Ananas meyvesi (10 g) ve saf suyu (50 mL) karıştırma (1/5, k/s), santrifüj (4000 rpm 10 dakika), üst sıvıyı 0.22 µm por çaplı steril filtre ile süzme	Viyolasein üretimi (kalitatif)	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	İnhibisyon zonu oluşumu	Musthafa et al. (2010)
	Viyolasein üretimi (kantitatif)	<i>C. violaceum</i> CV026	%89.22 inhibisyon	
	Piyosiyanın üretimi	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	%87.65 inhibisyon	

Bu tez çalışması boyunca gerçekleştirilen çalışmalardan *P. aeruginosa* PAO1 suşunda bakteriyel hareketin inhibisyonu, zar potansiyeli ve sitoplazmik pH değerine etkisi ile ilgili yapılan literatür taraması sonucunda ananas bitkisinin de içinde bulunduğu *Bromeliaceae* familyasından herhangi bir bitki ile bu amaçla herhangi bir çalışma yapılmadığı belirlenmiştir.

2.5. Nanopartikül sentezinde bitkisel ekstraktların indirgeyici ajan olarak kullanımı

“Yukarıdan aşağıya” (*top-down*) ya da “aşağıdan yukarıya” (*bottom-up*) metodlar olmak üzere metal nanopartikül sentezlemek için bir çok yöntem vardır. “Aşağıdan yukarıya” metodu piroliz, kimyasal buhar biriktirme, solvotermal tepkime, sol-jel üretim, hidroliz gibi yöntemleri içermektedir [Cushing, 2004; Semagina, 2009]. Nanopartiküllerin sentezinde yaygın olarak kullanılan fiziksel ve kimyasal

yöntemlerle istenilen boyutta ve morfolojide partiküller kısa sürede sentezlenebilmesine rağmen kullanılan reaktanların ve indirgeyici ajanların toksik olmaları, elde edilen nanopartiküllerin kararlılıklarının iyi olmaması ve/veya pahalı yöntemlerle sentezlenmeleri nedeniyle alternatif teknolojilerin araştırılması gerekmektedir [Narayanan and Sakthivel, 2010]. Yakın zamanda kullanılan ve iyi kararlılık veren ve nanopartikül özelliklerini kontrol edebilmeyi sağlayan bir başka kimyasal yöntem ise organometalik başlangıç maddesinin kararlaştırıcılarla çözelti ya da katı halde bozunuma uğratarak metal nanopartikül sentezinin gerçekleştirilmesidir [Kinayyigit, 2014a; Kinayyigit, 2014b]. Yine son yıllarda, endüstriyel ölçekte kolay üretime imkan sağlayan diğer bir metot; doğal, çevreyle dost, toksik olmayan ve canlı malzeme kullanılarak nanopartikül üretimine dayanan yeşil sentez ile nanomalzeme üretimi ortaya çıkmıştır. Yeşil nanoteknoloji kapsamında özellikle bitki ekstraktları ve mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bitki ekstratları fenol ve fenolik yapılar açısından zengindir ve toksik kimyasallar kullanılmaksızın yapısı itibarıyla indirgeyici ve stabilize edici özelliklere sahiptir [Kinayyigit, 2021]. Böylelikle, bitkisel atık ürün probleminin azaldığı, insan sağlığına zararı olmayan, kolay uygulanabilir ve ucuz yöntemlerin kullanılması sağlanmaktadır [Duncan, 2011].

Nanoteknolojinin gıda alanındaki uygulanabilirliği dört maddede toplanabilir: Bunlar; gıda işleme ve fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi, patojenlerin tespiti ve gıda güvenliğinin artırılması, biyoaktif maddeler ve nutrasötiklerin taşınması ve kontrollü salınımı, ve ürün kalitesi ve raf ömrünü olumlu yönde etkileyecek ambalajlama sistemlerinin geliştirilmesidir [Beykaya ve Çağlar, 2015]. Bu sebeple, özellikle bu tür teknolojilere imkan sağlayan, antibakteriyel ve antimikrobiyal özelliklere sahip bitki ekstraktlarının üretimi ve elde edilen ekstraktların metal nanopartiküllerin sentezinde hem indirgeyici hem de kaplama ajanı olarak kullanılması önem kazanmıştır. Etanol, karbon dioksit, klor dioksit, organik asit ve uçucu yağlar ve nanopartiküller gıda patojenlerinin üremesini engellemek amacıyla test edilmelerine rağmen bu ajanları içeren antimikrobiyal paket ürünleri ticari olarak hala sınırlıdır [Motelica et al., 2020]. Ancak, ABD ve Japonya'da gümüş esaslı antimikrobiyal ambalajlar kullanılmaya başlanmış ve Avrupa Birliği ülkelerinde de kullanım olgunluğuna erişmeye başlamıştır [Realini and Marcos, 2014].

Metal (Ag, Cu, Pd vb.) ve metal oksit (ZnO, TiO₂ vb.) nanopartikülleri (NP) yüksek yüzey alanı-hacim oranı ve fonksiyonlandırılmış yüzey ajanlarının yanı sıra metalik

özelliklerinden dolayı iyi antibakteriyel özelliklere sahiptirler. Yüzey atomları ve yüzeyi kaplayan fonksiyonel gruplar mikroorganizmalar ile daha iyi temas sağlayarak hücre zarına bağlanabilir ve küçük boyutları sayesinde bakteri içine nüfus edebilir [Sorbiun et al., 2018]. Ag NP'lerin insanlar için toksik olmadığı ancak bakteri, virüs ve diğer ökaryotik mikroorganizmaların büyümesini engellediği bildirilmiştir [Jeong et al., 2005]. Bu sebeple biyomedikal (yara bandı, dezenfektan vb.) uygulamalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında antioksidan özelliğinin yüksek olmasından faydalanılarak fıstık dış kabuğu su ekstraktı ile bakır nanopartikül elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinlikleri kimyasal yöntemlerle elde edilen bakır nanopartiküllerle karşılaştırılmıştır.

Fıstık bitkisinin kısımlarından elde edilen ekstraktlar ile nanopartikül sentezini konu alan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Gümüş [Gonca et al., 2022], bakır [Dahajipour-Heidarabadi and Nozari, 2021; Taghizadeh and Rad-Moghadam, 2018] ve çinko [Nejatian et al., 2023] gibi metaller fıstık kabuğu veya yaprağı su ekstraktlarının indirgeyici özellikleri sayesinde nanopartikül sentezinde kullanılmış ve bu nanopartiküllerin antibiyofilm [Gonca et al., 2022], organik boya degradasyonu [Taghizadeh and Rad-Moghadam, 2018] ve gıda koruyucu paketleme materyali üretiminde [Nejatian et al., 2023] kullanımları değerlendirilmiştir. Ancak bu tez çalışmasındaki gibi etanol çözeltisi ile MAE yöntemi ile elde edilen fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ekstraktının bakır nanopartikülü sentezinde kullanılabilirliği araştırılmamıştır. Bu çalışmada, biyoaktivite çalışmalarının yanında daha temiz bir sentez yöntemi olan “yeşil sentez” aracılığı ile nanopartikül sentezi için PVE ekstraktının potansiyeli incelenmiştir.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1.Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve saf malzemeler Çizelge 3.1’deki gibidir.

Çizelge 3.1: Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.

Malzeme	Marka
Etanol	Alkomed (Plovdiv, Bulgaristan)
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck (Darmstadt, Almanya)
Metanol	Merck (Darmstadt, Almanya)
Sodyum karbonat	Merck (Darmstadt, Almanya)
Alüminyum klorür	Merck (Darmstadt, Almanya)
Kuersetin	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya)
Gallik asit	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya)
Potasyum asetat	Merck (Darmstadt, Almanya)
Şekerler (fruktoz, glukoz, sükroz)	Biolife (Milano İtalya)
Amin kolon	GL Science (Japonya)
C-18 kolon	Kromasil (Göteborg, Sweden)
Asetonitril	Merck (Darmstadt, Almanya)
Asetik asit	Merck (Darmstadt, Almanya)
Mono potasyum fosfat	Merck (Darmstadt, Almanya)
Sülfürik asit	Merck (Darmstadt, Almanya)
Sodyum hidroksit	Merck (Darmstadt, Almanya)
DPPH	Alfa Aesar (Massachusetts, ABD)

Çizelge 3.1: Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler (devam).

Malzeme	Marka
Mikrotitrasyon plakası	TPP (Darmstadt, Almanya)
Mueller-Hinton besiyeri	Biolife (Milano İtalya)
Agar	Biolife (Milano İtalya)
Sodyum klorür	Merck (Darmstadt, Almanya)
Gentamisin	Merck (Darmstadt, Almanya)
Pepton	Biolife (Milano İtalya)
Maya özütü	AppliChem (Barselona, İspanya)
Triptik soya besiyeri	Biolife (Milano İtalya)
Kristal viyole	Merck (Darmstadt, Almanya)
Klor	ACE (Pescara, İtalya)
LIVE/DEAD™ BacLight™ boyama kiti	Thermo Fischer (Massachusetts, ABD)
Homoserin lakton	Abcam (Cambridge, Birleşik Krallık)
DMSO	Merck (Darmstadt, Almanya)
Kloroform	Merck (Darmstadt, Almanya)
Agaroz	Peqlab (Erlangen, Almanya)
Dibac	Biotium (California, ABD)
cFDA-SE	Biotium (California, ABD)

3.1.2.Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında fıstık ve ananas kabukları mutfak tipi bir öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Düzce, Türkiye) ile öğütüldü. Katı çöktürme işlemleri Gyrozen marka 1248R model (Daejeon, Kore) ve Eppendorf marka Centrifuge 5420 model santrifüjler ile gerçekleştirildi. Çözücülerin buharlaştırılması Heidolph marka Hei-VAP model (Bavyera, Almanya) bir döner buharlaştırıcı ile gerçekleştirildi.

Kimyasal malzemelerin ve tarımsal atıkların tartılmasında Kern marka 200-3 model (Balingen, Almanya) bir hassas terazi kullanıldı. Manyetik karıştırıcı olarak IKA marka RH basic 2 model (Almanya) bir cihaz kullanıldı. Besiyeri ve kültür pH değerleri Hanna Instruments HI 2211pH/ORP metre ile belirlendi.

Ekstrakt hazırlığı, bakteri hücrelerinin büyütülmesi ve fitokimyasal içerik belirlemede özel sıcaklık ve çalkalama koşullarını sağlamak amacıyla New Brunswick marka Innova 42 model (Hamburg, Almanya) bir inkübatör kullanıldı.

Ananas kabukları bir Vitris Ultra marka bir liyofilizatör cihazı ile dondurularak kurutuldu.

Statik koşullarda gerçekleşen inkübasyonlar için Thermo Scientific marka Heratherm IGS 60 model (Lagenselbold, Almanya) bir inkübatör kullanıldı. Bakteri kültürlerinin, fitokimyasal içerik belirlemede renge dayalı ölçümleri gerçekleştirilen örneklerin, biyofilm çalışmalarında kristal viyole ile boyanmış örneklerin, viyolasein ve piyosiyenin inhibisyonu deneylerine ait örneklerin absorbansları Simadzu UV-1280 model (Duisburg, Almanya) spektrofotometre ve BMG LABTECH FLUOstar Omega model bir mikroparka okuyucu (Offenburg, Almanya) ile ölçüldü. Örnekleri homojen hale getirmek amacıyla karıştırmada IKA Vorteks Genius 3 model (Deutschland, Almanya) bir hızlı karıştırıcı kullanıldı.

Floresan boyamalar sonucu elde edilen preparatlar Nikon marka Eclipse T_i model (Japonya) bir mikroskop ile görüntülendi. Elde edilen görüntülerin fotoğrafları Nikon Digital Sight model (Japonya) bir fotoğraf makinesi ile alındı.

Spesifik kimyasal analizler için Shimadzu marka (LC-20AD, Autosampler SIL-20AC, RID Dedektör RID-10A, UV Dedektör SPD-20A, Fırın CTD-10AS) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanıldı. HPLC analizleri öncesi hazırlanan mobil fazlar Weightlab marka ultrasonik su banyosu ile degaze edildi.

Tüm deney malzemelerinin ve hazırlanan besiyerlerinin sterilizasyonu bir otoklav cihazı (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) kullanılarak yapıldı.

Ekstrakt hazırlığında mikrodalga uygulaması Arçelik marka MD 574 S model (Türkiye) mikrodalga ile gerçekleştirildi. Hazırlanan besiyeri, kimyasal stokları ve tarımsal atıklar gibi soğuk koşullarda muhafaza edilmesi gereken materyaller Hotpoint marka (California, ABD) buzdolabında saklandı.

3.1.3. Kullanılan bakteri suşları ve büyüme sıcaklıkları

Bu tez çalışmasında ekstraktların biyoaktivitelerini incelemek amacıyla Gebze Teknik Üniversitesi Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı bünyesinde bulunan *Escherichia coli* ATCC 25922 (37 °C), *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (37 °C), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (37 °C), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (37 °C), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (37 °C), *Pseudomonas auroginosa* ATCC 27853 (37 °C), *Streptococcus uberis* ATCC 700407 (37 °C), *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (37 °C) ve *Chromobacterium violaceum* CV 026 (37 °C) suşları kullanıldı. Her bakterinin büyüme sıcaklıkları isminin yanında parantez içerisinde belirtilmiştir.

3.1.4. Kullanılan tarımsal atıklar

Taze fıstık meyveleri Adana'daki yerel bir satıcıdan, ananas kabukları ise yerel bir marketten temin edildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Tarımsal atıkların temini, ön hazırlığı ve muhafazası

Fıstık dış kabukları ayıklandı ve açık havada gölgede bir hafta boyunca kurutuldu. Kurutulmuş kabuklar bir mutfak tipi öğütücü aracılığı ile (20 g kabuk 1 dk süre ile 2 kez) toz haline getirilerek öğütüldükten sonra kullanıma kadar 4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Ananaslar satış için ananas soyma makinesi aracılığı ile kabukları soyulduktan sonra, açığa çıkan kabuklar markete ait soğuk hava deposunda en fazla bir gün muhafaza edildi. Daha sonra, yaklaşık 2×2×2 cm³ büyüklükte küpler halinde kesilen ananas kabukları bir liyofilizatör cihazı ile -30 °C'de 5 saat boyunca dondurulduktan sonra cihaz vakumu 10 pascal (Pa) basınca ayarlanarak 20 °C sıcaklıkta 24 saat boyunca kurutuldu. Kurutulan ananas kabukları bir öğütücü yardımı ile öğütüldü ve ardından paketlenerek kullanıma kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

3.2.2. Ekstraksiyon

3.2.2.1. Fıstık dış pembe kabuklarından ekstrakt eldesi

Fıstık kabuklarından biyoaktif bileşiklerce zengin ekstraktlar elde etmek amacıyla, etanol ve distile su ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldı. %60 etanol (s/s) çözeltisi daha yüksek antioksidan aktivite, fenolik ve flavonoid içerik elde etmek amacıyla Özbek ve ark. (2020) çalışması referans alınarak seçildi. Kurutulmuş fıstık kabuğu tozu ve ekstraksiyon çözeltisi 1/10 (katı madde/sıvı) oranında 100 mL ekstraksiyon çözeltisi içerisinde 10 g fıstık kabuğu tozu olacak şekilde 500 mL cam şişe içerisinde hazırlandı. Ekstraksiyon karışımı, mutfak tipi bir mikrodalga cihazı aracılığıyla mikrodalga ışınlamasına (140 W, 3 dakika) [Özbek et al. (2020) değiştirilerek kullanıldı] maruz bırakıldı. Bu işlemten sonra, karışım 4000 rpm dönme hızında, 4 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santifüj edildi. Üst sıvı kaba filtre kâğıdı aracılığı ile süzüldü ve elde edilen berrak ham ekstrakt döner buharlaştırıcı (80 rpm) aracılığı ile basınç altında buharlaştırılarak çözücünden uzaklaştırıldı ve yoğunlaştırıldı. Sonuçta 12 mL ekstrakt elde edilene kadar buharlaştırma devam ettirildi. Ekstraktlar kullanıma kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Fıstık kabuğu etanol ekstraktı PVE, fıstık kabuğu su ekstraktı PVD olarak belirtildi.

3.2.2.2. Ananas kabuklarından ekstrakt eldesi

Ananas kabuklarından biyoaktif bileşiklerce zengin ekstraktlar elde etmek amacıyla, etanol ve distile su ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldı. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin çalışmada kullanılan test bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkileri kuyu difüzyonu yöntemi ile test edilerek çalışma boyunca kullanılacak ekstraksiyon yöntemine karar verildi. Ekstraksiyonda ön deneme çalışmalarında ekstraksiyon çözeltisi olarak etanol kullanıldı. Kuru madde miktarı (10 veya 20 g), etanol konsantrasyonu (%60 veya %80 (s/s)), ön uygulamada inkübasyon sıcaklığı (4 °C veya oda sıcaklığında (25 °C) ve ön uygulamada çalkalama durumu (statik veya 200 rpm) gibi parametreler değiştirilerek ekstraksiyonda biyoaktiviteyi arttırmak amaçlandı.

Ekstraktlar ACE-1 (10 g ananas kabuğu ve 100 mL hacimde %60 (s/s) etanol çözeltisi içerir, ön uygulama yoktur), ACE-2 (10 g ananas kabuğu ve 100 mL hacimde %60 (s/s) etanol çözeltisi içerir, 4 °C bir gece statik inkübasyona maruz bırakıldı), ACE-3

(20 g ananas kabuğu ve 100 mL hacimde %60 (s/s) etanol çözeltisi içerir, oda sıcaklığında bir gece 200 rpm çalkalamalı inkübasyona maruz bırakıldı) ve ACE-4 (20 g ananas kabuğu ve 100 mL hacimde %80 (s/s) etanol çözeltisi içerir, oda sıcaklığında bir gece 200 rpm çalkalamalı inkübasyona maruz bırakıldı) olarak adlandırıldı (Çizelge 3.2).

Ön denemeler sonucunda Gram pozitif ve Gram negatif bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği olduğu belirlenen ACE-4, çalışma boyunca ananas kabuğu ekstraktlarını elde etmede kullanılacak yöntem olarak seçildi ve ACE olarak belirtildi. Ananas kabuğu su ekstraktı olan ACD ise benzer bir yöntemle elde edildi. ACE ekstraktından farklı olarak bir gecelik oda sıcaklığı inkübasyonuna maruz bırakıldı. Bu uygulama farkının sebebi, aynı yöntemin denenmesi sonucu bir gece sonunda ananas kabuğunun su içerisinde bozulması (kararma ve koku oluşumu) nedeni ile etkin bir ekstrakt elde edilememesidir.

Çizelge 3.2: Ananas kabuğu ekstraksiyon yöntemini belirlemede gerçekleştirilen ön denemeler.

Ekstraksiyon Parametreleri	ACE-1	ACE-2	ACE-3	ACE-4
Kuru madde	10 g	10 g	20 g	20 g
Etanol konsantrasyonu (%)	%60	%60	%60	%80
Ön uygulama	-	4 °C bir gece inkübasyon	Oda sıcaklığında bir gece 200 rpm inkübasyon	Oda sıcaklığında bir gece 200 rpm inkübasyon

Ekstraktlarının ön hazırlık aşamasının ardından ekstraksiyon karışımları mikrodalga ısınlamasına (140 W, 3 dakika) maruz bırakıldı [Özbek et al. (2020) değiştirilerek kullanılmıştır]. Gazlı bez yardımı ile posalarından ayrılan karışım, 4000 rpm dönme hızında, 4 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santifüj edildi. Üst sıvı kaba filtre kâğıdı aracılığı ile süzüldü ve elde edilen berrak ham ekstrakt döner buharlaştırıcı (80 rpm) aracılığı ile basınç altında buharlaştırılarak çözücünden uzaklaştırıldı ve yoğunlaştırıldı.

Sonuçta 8 mL ekstrakt elde edilene kadar buharlaştırma devam ettirildi. Ekstraktlar kullanıma kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Ekstraksiyon işleminin ardından tüm ekstraktların oda sıcaklığında pH değerleri bir pH metre kullanılarak ölçüldü.

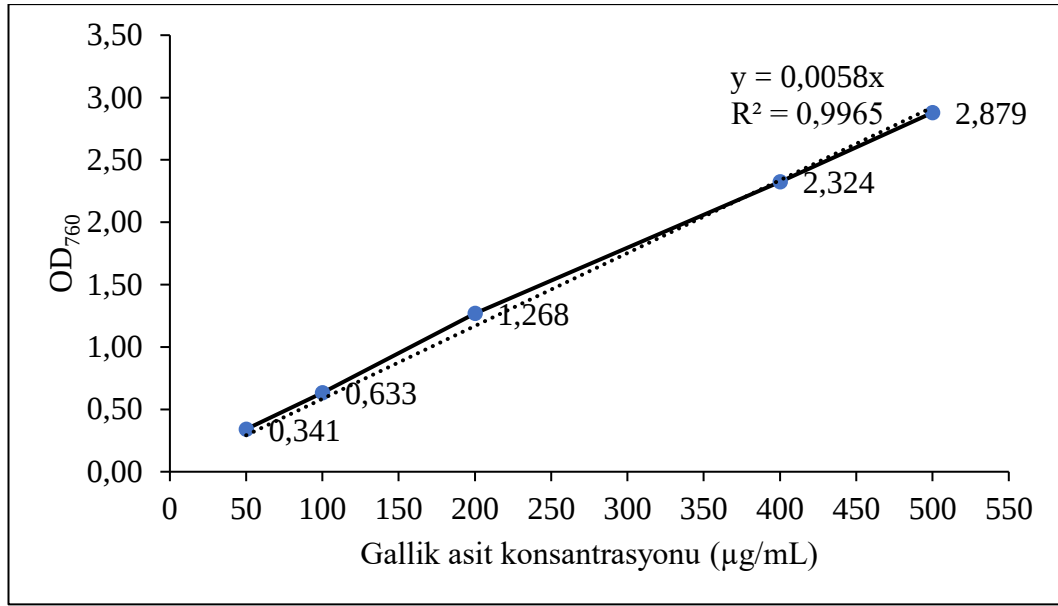
3.2.3. Ekstraktların kuru ağırlıklarının belirlenmesi

Çalışmada tarımsal atıklardan elde edilen PVE, PVD, ACE ve ACD ekstraktlarının kuru ağırlıkları bir etüv aracılığı ile 60 °C sıcaklığa maruz bırakılıp kurutularak belirlendi. Darası alınan mikrosantrifüj tüplerine 1 mL hacimde ekstraktlar aktarıldı. Ardından ağırlıkları bir hassas terazi yardımı ile ölçüldü. İki gün boyunca kurutulan ekstraktların bulunduğu tüplerin son ağırlıkları tekrar ölçüldü ve 1 mL ekstrakt içerisinde bulunan kuru madde miktarı belirlendi (mg/mL).

3.2.4. Ekstraktların fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Ekstraktların toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi

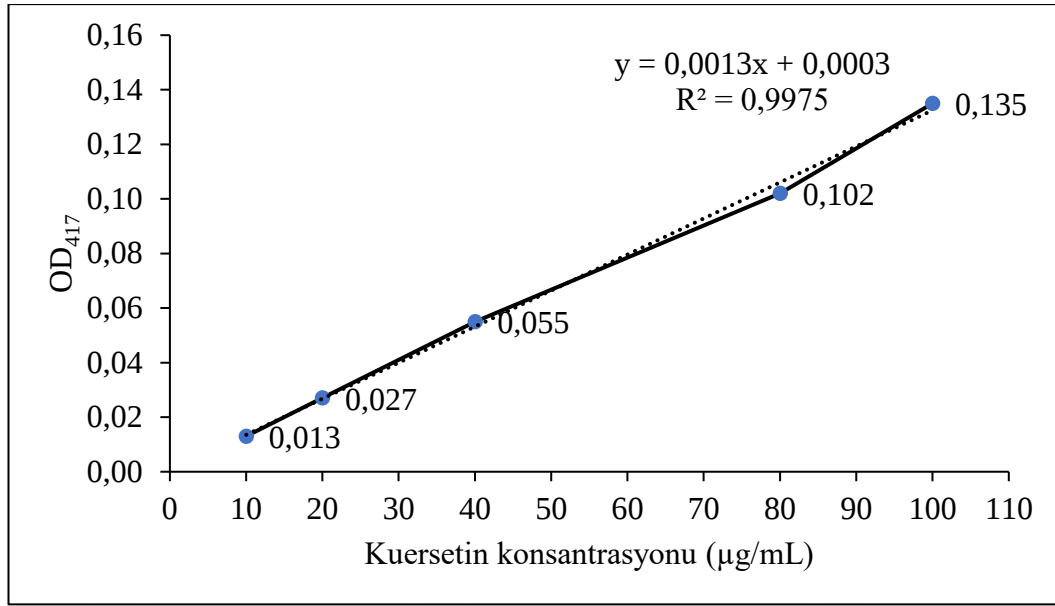
Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarları Hudz ve ark. (2019)'nın çalışması modifiye edilerek Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlendi. Standart kalibrasyonu gallik asidin farklı konsantrasyonlarını (50-500 µg/mL) içeren çözeltiler ile gerçekleştirildi. Saf metanol ile 50 kat seyreltilen 100 µL ekstrakt, 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ile 1500 µL saf su içerisinde karıştırıldı. Ardından 300 µL %20 (k/s) sodyum karbonat çözeltisi ilave edildi ve karışım vorteks aracılığı ile iyice karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta, 150 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, örneklerin ve standardın absorbans değerleri (OD₇₆₀) spektrofotometre aracılığı ile ölçüldü. Kontrol olarak ekstrakt yerine saf su kullanıldı. Bu test, farklı zamanlarda ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş en az üç farklı örnek ile, her ölçüm esnasında en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Sonuçlar oluşturulan standart kalibrasyon grafiğine göre (Şekil 3.1) ($y=5.8444x$, $R^2=0.9989$) gallik asit eşdeğeri cinsinden belirlendi (mg GA/g ekstrakt) [Hudz et al., 2019].



Şekil 3.1: Toplam fenolik içerik belirlemek amacıyla oluşturulan gallik asit standardına ait kalibrasyon grafiği.

3.2.4.2. Ekstraktların toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları alüminyum klorür yöntemi ile belirlendi. Saf metanol ile 50 kat seyreltilen ekstrakt ve farklı konsantrasyonlardaki kuersetin standardı (10-100 µg/mL), 100 µL alüminyum klorür (%10 (k/s)) ve 100 µL potasyum asetat çözeltisi (1M) 2.8 mL saf su içerisinde karıştırıldı. Kontrol için ekstrakt yerine 100 µL saf su kullanıldı. Örneklerin ve standartların absorbansları (OD₄₁₇) spektrofotometre aracılığı ile ölçüldü. Sonuçlar oluşturulan standart kalibrasyon grafiğine (Şekil 3.2) göre ($y=0.0013x+ 0.0003$, $R^2=0.9975$) kuersetin eşdeğeri cinsinden (µg KE/g ekstrakt) belirlendi [Namrata et al., 2017].



Şekil 3.2: Toplam flavonoid içerik belirlemek amacıyla oluşturulan kuersetin standardına ait kalibrasyon grafiği.

3.2.4.3. Ekstraktların şeker içeriklerinin belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının şeker içerikleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (HPLC) kullanılarak gerçekleştirildi (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ekstraktların şeker içerikleri refraktif indeks dedektörü ile (Shimadzu, Kyoto, Japan) Inertsil NH₂ kolonu kullanarak (5 µm, 4.6×250 mm, GL Sciences Inc.) belirlendi. Bunun için, glukoz, fruktoz ve süktroz standartları farklı konsantrasyonlarda hazırlandı (5, 10, 20, 40 and 50 mg/mL). Örnekler ve standart çözeltileri 3 µL hacminde injekte edildi. Kolon sıcaklığı olarak 25 °C' ve mobil faz %75 (s/s) asetonitril çözeltisi kullanıldı. Akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı [GL Sciences Inc., Üretici yöntemi].

3.2.4.4. Ekstraktların kuersetin içeriklerinin belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının kuersetin içeriklerini belirlemek için kromatografik ayırma C-18 kolonu (Kromasil, 250 mm×4.6 mm I.D.:5 µm) ve UV dedektörü (Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanıldı. HPLC analizleri, asetonitril ve %2 (s/s) asetik asit (pH 2.6) mobil fazının (60:40) izokratik elüsyonu aracılığı ile sağlandı. Akış hızı 1.3 mL/dakika, kolon sıcaklığı 35 °C ve deteksiyon dalga boyu 370 nm

olarak ayarlandı. Örneklerin injeksiyon hacmi 20 µL olarak yapıldı. Toplam yürütme süresi her bir örnek için 5 dakika olarak gerçekleşti [Ang et al., 2014].

3.2.4.5. Ekstraktların gallik asit içeriklerinin belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının gallik asit içeriklerini belirlemek için kromatografik ayırma C-18 kolonu (Kromasil, 250 mm×4.6 mm I.D.:5 µm) ve UV dedektörü (Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanıldı. HPLC analizi 0.01 M monopotasyum fosfat (KH₂PO₄):asetonitril mobil fazının (85:15; pH 3.2) izokratik elüsyonu aracılığı ile sağlandı. Akış hızı 0.75 mL/dakika, kolon sıcaklığı 30 °C ve deteksiyon dalga boyu 280 nm olarak ayarlandı. İnjesiyon hacmi 20 µL olarak gerçekleşti [Fatariah et al., 2014].

3.2.4.6. Ekstraktların asetik asit içeriklerinin belirlenmesi

Ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının askorbik asit içeriklerini belirlemek için kromatografik ayırma işlemi, C-18 kolonu (Kromasil, 250 mm×4.6 mm I.D.:5 µm) ve UV dedektörü (Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanıldı. HPLC analizi 0.025 M monopotasyum fosfat (KH₂PO₄) mobil fazının (pH 2.4) izokratik elüsyonu aracılığı ile sağlandı. Akış hızı 1.5 mL/dakika, kolon sıcaklığı 30 °C ve deteksiyon dalga boyu 210 nm olarak ayarlandı. İnjesiyon hacmi 20 µL olarak seçildi [Perkin Elmer organik asit deteksiyon metodu].

3.2.4.7. Ekstraktlardaki fitokimyasalların biyokimyasal testler aracılığı ile belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının kinon, kumarin, tannin ve saponin içeriklerirenk değişimine dayalı biyokimyasal testler ile incelendi.

3.2.4.7.1. Sülfürik asit yöntemi ile ekstraktlarda kinon varlığının belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktları saf etanol ile 1/10 (s/s) oranında seyreltildi. Konsantre sülfürik asit (1 mL) ve seyreltik ekstrakt (1 mL) karıştırıldı. Kırmızımsı renk oluşumu ortamda kinon varlığını işaret etti [Jacob and Shenbagaraman, 2011].

3.2.4.7.2. Ekstraktlarda kumarin varlığının belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktları 1/10 (s/s) oranında saf su ile seyreltildi. Test 1: 2 mL seyreltik ekstrakt üzerine 3 mL 2 N sodyum hidroksit çözeltisi eklendi. Bu karışımda sarı rengin gözlenmesi kumarin varlığını gösterdi. Doğrulama testi (Test 2): Üstteki karışımın üzerine 1 mL 5 N hidroklorik asit çözeltisi eklendi. Son olarak deney tüplerinin üst kısmında şeffaf/renksiz bir solüsyon oluşması kumarin varlığını ortaya koydu [X. A. Dominguez, M'etodos en Investigaci'on Fitoqu'ımica, LIMUSA, 1973].

3.2.4.7.3. Ekstraktlarda saponin varlığının belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktları 1/10 (s/s) oranında saf su ile seyreltildi. 2 mL seyreltik ekstraktın üzerine saf etanol eklendi ve hızlı bir şekilde vorteks aracılığı ile karıştırıldı. Köpük oluşumu ekstraktlarda saponin varlığını gösterdi [Rathore et al., 2012].

3.2.4.7.4. Ekstraktlarda tannin varlığının belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktları 1/10 (s/s) oranında saf su ile seyreltildi. 1 mL seyreltik ekstraktın içerisine 1 mL %5 (s/s) ferrik klorür eklendi. Mavimsi-yeşilimsi siyah renkte çökelti gözlenmesi ekstraktlarda tanin varlığını gösterdi [Firdouse and Alam, 2011].

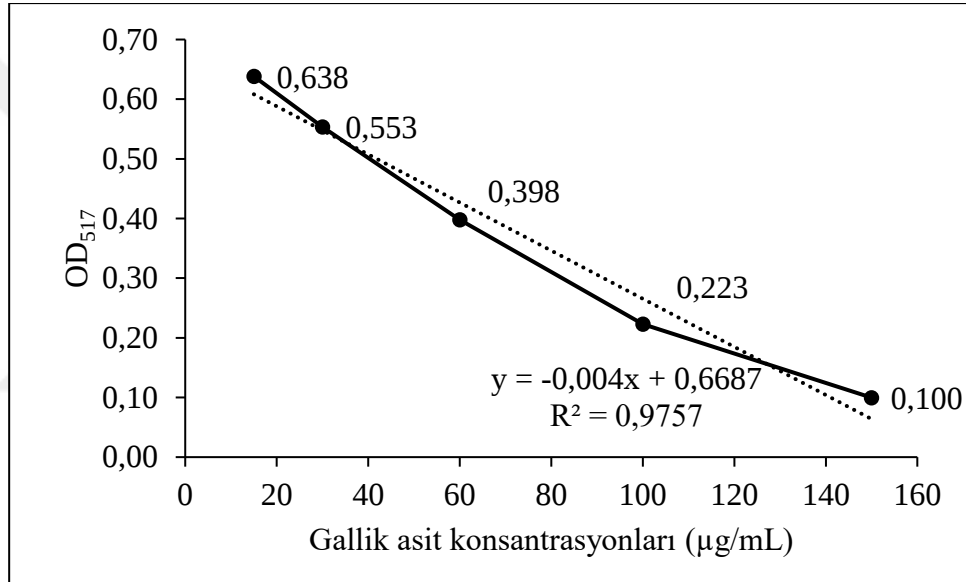
3.2.4.8. Ekstraktların antioksidan etkinliklerinin belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının antioksidan etkinlikleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme testi ile belirlendi. 3.9 mL 50 ppm DPPH çözeltisi ve 0.1 mL farklı konsantrasyonlarda metanol ile seyreltilen ekstraktlar test tüpleri içerisinde karıştırıldı. Örnekler karanlıkta, 37 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca çalkalanarak (120 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerin ve standartların absorbans değerleri (OD₅₁₇) spektrofotometre aracılığı ile ölçüldü. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla fıstık kabuğu ekstraktları için gallik asit (25-250 µg/mL) ve ananas kabuğu ekstraktları için gallik ve askorbik asidin (100-350 µg/mL)

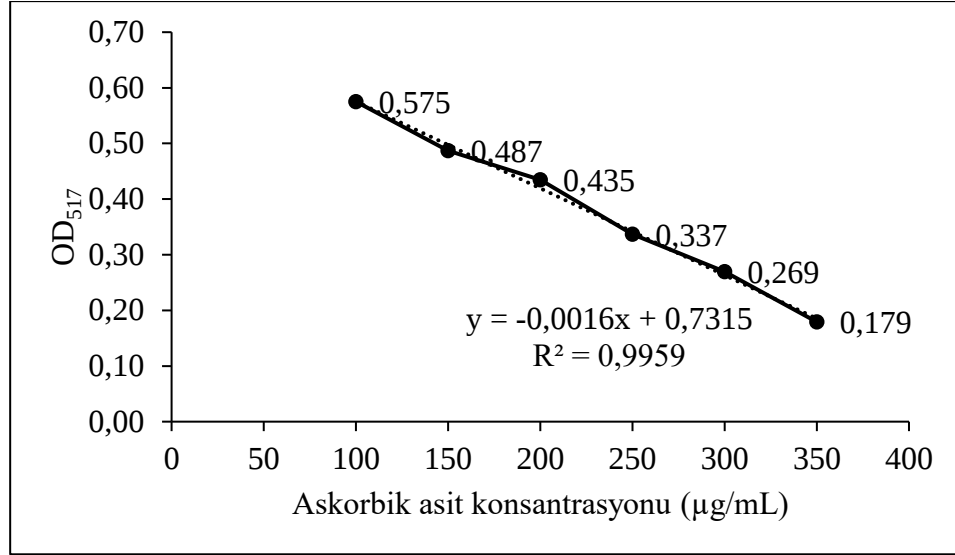
antioksidan etkinliği de farklı konsantrasyonlarda değeriendirildi. Ekstraktların radikal süpürücü etkileri (%) aşığıdaki formüle göre hesaplandı:

$$DPPH \text{ Süpürücü Etkisi (\%)} = \frac{Abs \text{ kontrol} - Abs \text{ örnek}}{Abs \text{ kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

DPPH serbest radikalının %50'si üzerinde ekstraktların süpürücü konsantrasyonları (SC₅₀), gallik asit ve askorbik asit ile oluşturulan standart kalibrasyon grafiği ile karşılaştırılarak belirlendi (Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.) [Özbek et al., 2020].



Şekil 3.3: SC₅₀ değeriini hesaplamada kullanılan gallik asit standardına ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.4: SC₅₀ değerlerini hesaplamada kullanılan askorbik asit standardına ait kalibrasyon grafiği.

3.2.4.9. Ekstraktların içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi

Ekstraktların içerdiği fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometrisi yönteminde faydalanıldı. Tarama 550-4000 nm dalgaboyu arasında gerçekleştirildi. Analizler Gebze Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.2.5. Ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi

Ekstraktların antimikrobiyal etkinlikleri, *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *P. auroginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarına karşı, kuyu difüzyonu, minimal bakterisidal ve inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi ve zamana bağlı ölüm testi ile incelendi.

3.2.5.1. Kuyu difüzyonu yöntemi ile ekstraktların antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi

Test bakterileri bir gece önceden Mueller-Hinton sıvı (MHB) besiyerinde *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 *P. auroginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407 suşları için 37 °C sıcaklıkta, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633

suşları için ise 30 °C sıcaklıkta önkültüre alındı. Daha önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar (MHA) besiyeri, Petri kaplarına eşit hacimlerde (17 mL) olacak şekilde steril koşullarda döküldü ve kullanıma kadar 4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Besiyeri hacminin eşit olmasına açılacak kuyulara aktarılabacak ekstrakt hacminin eşit olmasına ve böylece ekstraktın eşit koşullarda difüze olmasını sağlanmasına dikkat edildi. Bir gece boyunca çoğaltılan test bakterilerinin optik yoğunlukları, yaklaşık 0.1 OD₆₀₀ olacak şekilde steril fizyolojik tuzlu su ile gerektiğinde seyreltilerek ayarlandı. 100 µL bakteri süspansiyonu MHA besiyerine aktarıldı ve yayıldı. Hücreler sabitlendikten sonra (yaklaşık 30 dakika) steril koşullar altında 6-7 mm çapında kuyular açıldı. Ekstraktlar su ile farklı oranlarda seyreltildikten sonra (fıstık kabuğu ekstraktları için 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32; ananas kabuğu ekstraktları için 1/1, 1/2, 1/4, 1/8) kuyulara eşit hacimde (40 µL) yüklendi. Gentamisin (50 ve 1000 µg/mL) inhibisyon kontrolü olarak kullanıldı. Optimal büyüme sıcaklıklarında bir gecelik inkübasyonun sonunda, test bakterilerine ait inhibisyon zon çapları (mm) ölçüldü.

3.2.5.2. Ekstraktların minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının (MBK) belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının bakteriyel büyüme üzerine inhibe edici etkisi 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları kullanılarak sıvı kültürde incelendi. Test bakterileri bir gece önceden MHB besiyerinde *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *P. auroginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407 suşları için 37 °C sıcaklıkta, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşları için ise 30 °C sıcaklıkta önkültüre alındı. Seri dilüsyon (2 kat) yöntemi ile ekstraktlar farklı oranlarda (2^1 - 2^{12}) seyreltildi. Kuyucuklardaki final kültür hacmi 150 µL'dir, her kuyuda MHB besiyeri ve farklı oranlarda seyreltilmiş ekstraktlar bulunmaktadır. Kuyucuklardaki son hücre konsantrasyonu 10^6 kob/mL olarak ayarlandı [Jafari-Sales and Pashazadeh, 2020]. Her deney içerisindeki her uygulama 2 tekrarlı olacak şekilde, her deney üç kez tekrar edildi. 24 saatlik statik inkübasyon sonunda kültürler seri dilüsyon yöntemi ile seyreltilerek Luria-Bertani (LB) agar besiyerine ekildi. 24 saatlik statik inkübasyonun ardından ekstrakt uygulanan ve uygulanmayan bakterilerin koloni oluşturma birimleri (kob) sayıldı. Kontrolle kıyaslanarak ekstraktların minimal bakterisidal (MBK) ve inhibisyon (MİK) konsantrasyonları belirlendi.

3.2.5.3. Ekstraktların test bakterileri üzerinde zamana bağlı olarak büyüme eğrilerine etkilerinin belirlenmesi

MİK ve MBK deneylerinden elde edilen sonuçlar gözönünde bulundurularak, ileri çalışmalarda ekstraktların sekiz kat seyrelterek kullanılmasına karar verildi. Test bakterilerinin büyümelerine etkilerini belirlemek amacıyla Darah et al. (2017) ve Etame et al. (2017)'nın çalışmaları üzerinde bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Test bakterileri bir gece önceden MHB besiyerinde *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *P. auroginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407 suşları için 37 °C sıcaklıkta, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşları için ise 30 °C sıcaklıkta önkültüre alındı. Bir gecelik önkültürlerin hücre konsantrasyonları, 15 mL MHB besiyeri içeren 50 mL Erlenmayer içerisinde 1.5×10^6 kob/mL olacak şekilde ayarlandı. Erlenler içerisine final ekstrakt konsantrasyonu 1/8 (s/s) olacak şekilde ekstrakt ilave edildi ve her bakteri için optimum üreme sıcaklığında 180 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyonun başlamasıyla 0-2 saat arasında her 45 dakikada; 2-12 saat arasında her iki saatte; 12 saatten sonra ise 24. saatte örnek alındı. Gerektiğinde seri dilüsyon gerçekleştirilerek LB agar besiyerine örnekler ekildi ve 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayıldı. Koloni sayılarına göre ekstrakt ile inkübe edilen ve edilmeyen kontrol uygulamaları arası fark değerlendirilerek, ekstraktların bakterilerin logaritmik büyümelerine etkileri belirlendi. Her deney içerisindeki her uygulama 2 tekrarlı olacak şekilde, her deney üç kez tekrar edildi [Darah et al., 2013; Etame et al., 2018].

3.2.6. Ekstraktların antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi

Ekstraktların antibiyofilm etkilerini belirlemek üzere *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *P. auroginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 bakteri suşları kullanıldı. Bakterilerin biyofilm oluşturma kapasiteleri yarı kantitatif yöntem olan tutunma testi ile U-tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarında, 48 saatlik inkübasyon ile gerçekleştirildi. Biyofilm oluşumu %2 (k/s) glukoz içeren triptik soya sıvı besiyerinde (TSB) sağlandı.

3.2.6.1. Ekstraktların biyofilm oluşumunu önleyici etkisi

Ekstraktların biyofilm oluşumu engelleyici etkisi sekiz kat seyreltilmiş ekstrakt, %2 (k/s) glukoz ve 0.5 OD₆₀₀ bakteri içeren TSB besiyeri içeren 96 kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plakalarında gerçekleştirildi. Toplam kültür hacmi 200 µL'dir. Ekstraktların olgun biyofilmler üzerindeki etkisini değerlendirmek hedeflendiğinden bakteriler 48 saat boyunca optimum büyüme sıcaklıklarında inkübe edildi. İlgili teste ait kontrol grupları Çizelge 3.3'teki gibidir.

Çizelge 3.3: Biyofilm önleme çalışmasında tasarlanan kontrol grupları.

	Bakteri yoğunluğu	Antibiyofilm ajan
Biyofilm oluşum kontrolü	0.5 OD ₆₀₀	-
Biyofilm önleme kontrolü	0.5 OD ₆₀₀	100 µg/mL gentamisin
Negatif kontrol	-	1/8 (s/s) ekstrakt ve 100 µg/mL gentamisin

48 saatlik inkübasyon sonunda, kültürler nazıkçe döküldü ve saf su ile 3 kez durulanarak tutunmamış hücreler mikropalakadarki biyofilm tabakasından uzaklaştırıldı. 200 µL kristal viyole çözeltisi (0.5 % (k/s)) kuyucuklara aktarıldı ve 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Boya ile inkübasyonun ardından kristal viyole içeren kuyucuklar boşaltılıp 3 kez nazıkçe durulandı. Ters çevrilip süzülmesinin takiben kuyucuklara 200 µL hacminde %96 etanol aktarıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Plakalarda bulunan etanolla çözündürülmüş boyanmış örnekler temiz plakalara aktarıldı ve absorbans değerleri 575 nm dalgaboyunda bir çoklu plaka okuyucu aracılığı ile okutuldu. Ekstraktların ve kontrolün biyofilm önleme oranları (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı [Mohsenipour and Hassanshahian, 2015]:

$$\text{Biyofilm inhibisyonu (\%)} = \frac{(\text{Kontrol Abs 575} - \text{Test Abs 575})}{\text{Kontrol Abs 575}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.6.2. Ekstraktların oluşan biyofilmi ortadan kaldırma etkinliklerinin belirlenmesi

Ekstraktların biyofilm giderme etkinlikleri 48 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm tabalarının üzerine sekiz kat seyreltilmiş ekstrakt uygulaması ile incelendi. İnkübasyon 96 kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plakalarında gerçekleştirildi. İlgili teste ait kontrol grupları Çizelge 3.4'teki gibidir.

Çizelge 3.4: Biyofilm ortadan kaldırma çalışmasında tasarlanan kontrol grupları.

	Bakteri yoğunluğu	Antibiyofilm ajan
Biyofilm oluşum kontrolü	0.5 OD ₆₀₀	-
Biyofilm giderme kontrolü	0.5 OD ₆₀₀	200 ppm klor
Negatif kontrol	-	1/8 (s/s) ekstrakt ve 200 ppm klor

48 saatlik inkübasyon sonrasında, kültürler nazikçe döküldü ve saf su ile 3 kez durulanarak tutunmamış hücreler mikropalaklardaki biyofilm tabakasından uzaklaştırıldı. Sekiz kat seyreltilmiş ekstraktlar 200 µL hacimde biyofilm tabakalarının üzerine aktarıldı ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Aynı koşullarda 200 ppm klor çözeltisi de biyofilm tabakalarına 5 dakika boyunca muamele edildi. Ekstraktlar ve klor uygulamalarını içeren plakalar döküldü ve saf su ile üç kez durulandı. 200 µL kristal viyole çözeltisi (0.5 % (k/s)) kuyucuklara aktarıldı ve 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Boya ile inkübasyonun ardından kristal viyole içeren kuyucuklar boşaltılıp 3 kez nazikçe durulandı. Ters çevrilip süzülmesinin takiben kuyucuklara 200 µL hacminde %96 etanol aktarıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Plakalarda bulunan etanolla çözdürülmüş boyanmış örnekler temiz plakalara aktarıldı ve absorbans değerleri 575 nm dalgaboyunda bir çoklu plaka okuyucu aracılığı ile okutuldu. Ekstraktların ve kontrolün biyofilm giderme oranları (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı [Mohsenipour and Hassanshahian, 2015]:

$$\text{Biyofilm giderme (\%)} = \frac{(\text{Kontrol Abs 575} - \text{Test Abs 575})}{\text{Kontrol Abs 575}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.7. Biyofilm tabakalarının floresan mikroskobu aracılığı ile incelenmesi

Biyofilm tabakalarındaki hücrelerin canlılık durumu floresan boyama kiti ile boyanarak değerlendirildi. Gram-pozitif *S. aureus* ATCC 25923 ve Gram-negatif *E. coli* ATCC 25922 suşları floresan mikroskobu ile incelenmek üzere seçildi. İlgili bakteri suşları tez kapsamında kullanılan biyofilm önleme yöntemine göre 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarında biyofilm oluşturmaları üzere ekstraktlar varlığında 48 saat boyunca statik koşullarda kültüre alındı. Biyofilm önleme kontrolü olarak, biyofilm ortamına 100 µg/mL gentamisin eklendi. Statik koşullarda, 37 °C sıcaklıkta 48 saat süren inkübasyonun ardından, hücreler toplandı ve LIVE/DEAD™ BacLight™ bakteriyel floresan boyama kiti kullanılarak boyandı. Görüntüler oda sıcaklığında 20× büyütmeyle bir floresan mikroskop kullanılarak alındı. Görüntülerin işlenmesi, Fiji-ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi ve görüntüler SYTO 9 yeşil-floresan ve propidyum iyodür kırmızı-floresan görüntülerin birleşimi olarak sunuldu.

3.2.8. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin belirlenmesi

Ekstraktların kalitatif ve kantitatif antiquorum sensing etkilerini değerlendirmek amacıyla *C. violaceum* ATCC 12472 ve *C. violaceum* CV 026 bakterileri kullanıldı. Kalitatif ve kantitatif analizler için sırasıyla inhibisyon zon çapı (mm) ve OD₅₈₅ ölçümleri gerçekleştirildi.

3.2.8.1. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif belirlenmesi

15 g/L agar içeren LB besiyeri hazırlandı. Bakteriler için uygun sıcaklığa gelene kadar soğuması beklenen LB besiyeri içerisini son hücre yoğunluğu 0.1 OD₆₀₀ olacak şekilde *C. violaceum* ATCC 12472 aşılandı. Eşit hacimde (17 mL) *C. violaceum* ATCC 12472 içeren LB katı besiyerleri steril petrilere döküldü. Bakteri içeren besiyerlerinin donmasının ardından steril koşullarda besiyerleri üzerinde 6-7 mm çaplı kuyucuklar açıldı. Eşit hacimde ve derinlikteki kuyucuklara, farklı oranlarda seyreltilen ekstraktlar

(1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 (s/s)) aktarıldı. Petri kapları 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 37 °C sıcaklığa bir gecelik statik inkübasyon için transfer edildi. Bir gecelik inkübasyonun sonunda kuyuların çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü (mm).

3.2.8.2. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif belirlenmesi

C. violaceum CV 026 yeter sayı algılama molekülü homoserin laktonu üretemeyen mutant bir suştur. Ortama dışarıdan homoserin lakton (HSL) ilave edilmedikçe iletişim kuramaz ve dolayısıyla mor renkli pigment viyolaseini üretemez. Bu çalışmada ekstraktların yeter sayı algılama (anti-QS) etkilerini belirlemek amacıyla *C. violaceum* CV 026, kültür ortamına yapay olarak ilave edilen homoserin lakton (0.25 µg/mL) ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar (1/8, 1/32, 1/128, 1/512 (s/s)) ile birlikte kültüre alındı [Mouradi et al., 2020]. İnkübasyon 20 mL kültür içeren 50 mL erleninde 30 °C sıcaklıkta ve 150 rpm hızda çalkalanarak 24 saat boyunca devam ettirildi [Choo et al. (2006) değiştirilerek kullanıldı]. İnkübasyon sonunda iyice karıştırılmış erlenlerden 1 mL örnek ayrıldı ve 10.000 g dönme hızında 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pellet üzerine 1 mL DMSO eklendi (Çizelge 3.5). DMSO içeren pelletler pipetleme yaparak ve vorteks yardımı ile iyice çözdürüldü ve tekrardan 10.000 g dönme hızında 5 dakika santrifüj edildi. Çözünen örnekler 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasına aktarıldı ve absorbans değerleri 585 nm dalgaboyunda ölçüldü. Ekstraktların viyolasein inhibisyon etkileri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Viyolasein inhibisyonu (\%)} = 100 - \frac{(\text{Kontrol Abs 585} - \text{Test Abs 585})}{\text{Kontrol Abs 585}} \times 100 \quad (3.4)$$

Çizelge 3.5: Mutant *C. violaceum* CV 026 aracılığıyla ekstraktların kantitatif quorum sensing inhibisyonu etkisini belirlemek için oluşturulmuş deneysel plan.

Materyal	CV 026 kontrol	HSL kontrol	Uygulama	Son Konsantrasyon
LB besiyeri (2x)	10 mL	10 mL	10 mL	1x
<i>C. violaceum</i> CV 026	1 mL	1 mL	1 mL	1 x 10 ⁸ kob/mL
N-hegzanoil homoserin lakton	-	1 mL	1 mL	0.25 µg/mL
Ekstraktlar	-	-	2.5 mL; 625 µL; 156.25 µL; 39.06 µL	1/8; 1/32; 1/128; 1/512
DMSO	1 mL	-	-	<0,004 % (s/s)
Toplam hacim	20 mL	20 mL	20 mL	

3.2.8.3. Ekstraktların yeter sayı algılamaya etkisinin kantitatif değerlendirilmesinde *C. violaceum* CV 026 suşunun canlılık durumunun belirlenmesi

Viyolasein inhibisyonu testi esnasında *C. violaceum* CV 026 hücrelerinin canlılığını değerlendirebilmek amacıyla 24 saatlik inkübasyon sonunda kültürlerden örnek alındı. Gerektiği durumlarda seri dilüsyon yöntemi ile seyreltilerek LB katı besiyerine ekildi ve bir gece 30 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. *C. violaceum* CV 026 hücrelerinin ekstrakt varlığında büyüme inhibisyonları (%) belirlendi.

3.2.9. Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunda piyosiyanin üretimini engelleyici etkilerinin belirlenmesi

3.2.9.1. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun piyosiyanin üretmesi amacıyla kültüre alınması

P. aeruginosa PAO1 suşunun ürettiği piyosiyanin pigmentin miktarına ekstrakt varlığının etkisi incelendi. Önkültür için inkübasyon 500 mL erlen içerisinde 100 mL LB besiyerinde gerçekleştirildi. Statik koşullarda, 37 °C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edilen kültürler, inkübasyon sonunda 4000 rpm dönme hızında 5 dakika

boyunca oda sıcaklığında boyunca santrifüj edildi. Üst sıvıları dökülen örneklerin pelletleri üzerine 20 mL ultra saf su eklendi ve çözündürüldü. Aynı işlem iki kez daha tekrar edildi. Tamamen renksizleşen kültür süspansiyonu kullanılarak final hücre konsantrasyonu 0.05 OD₆₀₀ olacak şekilde ayarlandı. İnkübasyon 24 mL LB sıvı besiyeri içeren 50 mL erlen içerisinde gerçekleştirildi. Ekstraktlar besiyeri içerisinde finalde 1/8 (sıvı/sıvı (s/s)) oranında seyrelmiş olacak şekilde ilave edildi. Kontrol olarak ekstrakt ilave edilmemiş kültür kullanıldı. İnkübasyon 37 °C sıcaklıkta 130 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilecektir.

3.2.9.2. Piyosiyanın inhibisyonunun belirlenmesi

Bir gecelik inkübasyon sonunda örnekler 10 dakika boyunca 10000 rpm dönme hızında santrifüj edildi. Üst sıvıdan 5 mL ayrıldı ve bir deney tüpü içerisinde 3 mL kloroform üzerine eklendi. Karışım 20 saniye boyunca bir vorteks aracılığı ile karıştırıldı. Ardından örnekler, 10 dakika boyunca 5000 rpm dönme hızında santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüp tabanında oluşan mavi renkli kısımdan 3 mL kadar alındı ve yeni bir deney tüpüne aktarıldı. Üzerine 2 mL 0.2 M hidroklorik asit eklendi ve 20 saniye boyunca bir vorteks ile karıştırıldı. Örneklerin absorbans değerleri 520 nm dalga boyunda ölçüldü. Üretilen piyosiyanın miktarı (µg/mL), elde edilen absorbans değerinin 17.072 ile çarpılması ile hesaplandı. Piyosiyanın inhibisyon oranı (%) pozitif kontrolün ürettiği piyosiyanın miktarı (PM) ile oranlanarak hesaplandı [Essar et al., 1990; Jain et al., 2017].

$$\text{Piyosiyanın Miktarı } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) = \text{OD}(520) \times 17.072 \quad (3.5)$$

$$\text{Piyosiyanın inhibisyonu } (\%) = 100 - \frac{(\text{Kontrol PM} - \text{Test PM})}{\text{Kontrol PM}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.10. Ekstraktların bakteriyel harekete etkisinin belirlenmesi

3.2.10.1. Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunda süzülme hareketini engelleyici etkisinin belirlenmesi

1/8 (s/s) oranında ekstrakt içeren nutrient agar (NA) besiyeri içerisinde *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı ekstraktların süzülme hareketine etkileri değerlendirildi. Pepton (5 g/L), maya özütü (3 g/L), NaCl (5 g/L) ve agar (%1.5 (katı/sıvı (k/s))) içerecek şekilde

(pH. 6.8, 25 °C) süzülme besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı. Otoklav sonrası soğuduktan sonra 1/8 (s/s) oranında fıstık ve ananas kabuğu ekstraktları eklendi ve petrilere 10 mL hacimde döküldü. Besiyerleri bir gece boyunca donmaları için oda sıcaklığında bekletildi. Bir gün önceden hazırlanana LB agarda büyütülmüş *P. aeruginosa* PAO1 hücrelerinden steril kürdan ile bir koloni alınıp NA besiyerine aktarıldı ve 72 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon esnasında nem kaybını önlemek amacıyla petrilere parafilm ile sarıldı [Koh and Tham (2011) geliştirilerek kullanılmıştır]. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapı ölçüldü (mm) ve kontrolle karşılaştırılarak süzülme inhibisyon oranı (%) belirlendi.

3.2.10.2. Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunda yüzme hareketini engelleyici etkilerinin belirlenmesi

Fıstık ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarını 1/8 (s/s) oranında içeren yüzme besiyeri içerisinde *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme hareketine ekstraktların etkileri değerlendirildi. Pepton (10 g/L), sodyum klorür (5 g/L) ve agaroz (3 g/L) içerecek şekilde yüzme besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı. Otoklav sonrası soğuduktan sonra 1/8 (s/s) oranında fıstık ve ananas kabuğu ekstraktları eklendi ve petrilere 10 mL hacimde döküldü. Besiyerleri bir gece boyunca donmaları için oda sıcaklığında bekletildi. Bir gün önceden hazırlanmış LB agarda büyütülmüş *P. aeruginosa* PAO1 hücrelerinden steril kürdan ile bir koloni alınıp besiyerine aktarıldı ve 72 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon esnasında nem kaybını önlemek amacıyla petrilere parafilm ile sarıldı [Üreyen Esertaş et al. (2022) geliştirilerek kullanıldı]. İnkübasyon sonunda oluşan zon ölçüldü (mm) ve kontrolle karşılaştırılarak yüzme inhibisyon oranı (%) belirlendi.

3.2.11. Ekstraktların seçili bakteriler üzerinde hücre zar potansiyeline etkilerinin belirlenmesi

Hücre zar potansiyeline fıstık ve ananas kabuğu ekstraktlarının etkisini belirlemek üzere voltaj değişimine duyarlı bir floresan boya olan DiBAC₄(3) (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol) kullanıldı. Ekstraktların zar potansiyeline etkisi *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına karşı test edildi. Mueller-Hinton sıvı besiyerinde bir gece önkültüre alınan hücreler, bir gecenin sonunda taze besiyerine 1/10 (s/s) oranında aktarıldı ve 128 rpm çalkalama hızında kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6 olana kadar (3-4 saat) inkübasyon devam ettirildi.

Hücre süspansiyonlarına son boya konsantrasyonu 0.5 µM olacak şekilde DiBAC₄(3) eklendi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Siyah renkli düz tabanlı 96 kuyucuklu plakalara aktarılan kültürler ve ekstraktlar, son ekstrakt konsantrasyonu 1/8 (s/s) olacak şekilde karıştırıldı ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Kontrol olarak 100 µg/mL gentamisin kullanıldı. Ardından mikroparka içerisindeki örneklerin floresan yoğunlukları bir çoklu plaka okuyucu aracılığı ile ölçüldü (eksitasyon: 490 nm, emisyon: 520 nm; eksitasyon yarı genişliği 5 nm, emisyon yarı genişliği 10 nm) [Gonelimali et al., 2018].

3.2.12. Ekstraktların seçili bakteriler üzerinde sitoplazmik pH üzerine etkisinin belirlenmesi

Sitoplazmik pH üzerine fıstık ve ananas kabuğu ekstraktlarının etkisini belirlemek üzere floresan özellikli cFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) boyası kullanıldı. Ekstraktların sitoplazmik pH üzerine etkisi etkisi *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşları üzerinde test edildi. LB sıvı besiyerinde bir gece önkültüre alınan hücreler, bir gecenin sonunda taze besiyerine 1/10 (s/s) oranında aktarıldı ve 128 rpm çalkalama hızında ve 37 °C sıcaklıkta kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6 olana kadar (3-4 saat) inkübasyon devam ettirildi. Santrifüj edilen kültürler (4000 rpm, 4 °C, 15 dakika) 50 mM HEPES tamponu ile iki kez yıkanıp santrifüj edildi. Elde edilen pellet, içerisinde 10 µM cFDA-SE boyası içeren 50 mM fosfat tamponunda çözündürüldü ve 1 saat boyunca karanlık koşullarda, 37 °C sıcaklıkta, statik inkübasyona bırakıldı. Santrifüj edilen boyanmış kültürlerden (4000 rpm, 4 °C, 15 dakika), bir kez daha 50 mM HEPES tamponu ile yıkandı. Santrifüj sonrası elde edilen pelletler, 10 mM glukoz içeren 50 mM fosfat tamponu içerisinde çözündürüldü ve 30 dakika boyunca karanlık koşullarda, 37 °C sıcaklıkta, statik inkübasyona bırakıldı. Siyah renkli düz tabanlı 96 kuyucuklu plakalara aktarılan kültürler ve ekstraktlar, son ekstrakt konsantrasyonu 1/8 (s/s) olacak şekilde eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Kontrol olarak 100 µg/mL gentamisin kullanıldı. Ardından mikroparka içerisindeki örneklerin floresan yoğunlukları bir çoklu plaka okuyucu aracılığı ile ölçüldü (eksitasyon: 490 nm, emisyon: 520 nm; eksitasyon yarı genişliği 5 nm, emisyon yarı genişliği 10 nm) [Sánchez et al., 2010; Gonelimali et al., 2018].

3.2.13. Ekstraktlar aracılığı ile nanopartikül sentezi ve sentezlenen nanopartikülün antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi

Bakır nanopartikül eldesi için 100 mg Cu içeren $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5(\text{H}_2\text{O})$, 100 mL hacimlik beher içerisinde, 50 ml saf su ile karıştırıldı. Manyetik karıştırıcı yardımı ile 15 dakika boyunca karıştırılan karışım üzerine 20 mL PVE ekstraktı damla damla eklendi. Karıştırma işlemi 3 saat boyunca devam ettirildi. Santrifüj edilen örnekler 80 °C sıcaklıkta vakumlu ortamında etüvde kurutuldu.

Nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinlikleri Bölüm 3.2.5.2’de bahsedildiği şekilde seri dilüsyon yönteminden yararlanılarak gerçekleştirildi. Nanopartiküller farklı konsantrasyonlarda (1000, 500, 250... 62,5 µg/mL) olacak şekilde saf su içerisinde seyreltilerek MHB sıvı besiyeri içeren kültür ortamına eklendi. İnkübasyon sonunda (24 saat, 37 °C sıcaklıkta, statik) gerektiğinde seyreltilerek LB agar besiyerlerine ekildi ve canlı sayımları yapıldı. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırılarak inhibisyon durumu değerlendirildi.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM, Philips XL30 SFEG) ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi ile (EDS, Bruker), nanopartiküllerin dokusal ve elementel analizi karakterize değerlendirildi.

3.2.14. İstatistiksel analizler

Bu tez çalışmasında tüm deneyler en az üç kez tekrar edildi. İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2016 programı ile belirlendi. Çalışmalara ait *p* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile belirlendi. Böylece fıstık kabuğu etanol ile su ekstraktı ve ananas kabuğu etanol ile su ekstraktı ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak uygulamalar arasında anlamlı fark olup olmadığı saptandı.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraktların kuru ağırlıkları

Ekstraksiyon aşamasından sonra örneklerin yüksek sıcaklıkta kurutulması ile her bir ekstraktın içerdiği kuru madde miktarı belirlendi. Fıstık dış pembe kabuğunun etanol ekstraktı (PVE) 329.0 ± 4.24 mg/mL, su ekstraktı (PVD) ise 240.5 ± 13.44 mg/mL kuru madde içerdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının ise sırasıyla 382.5 ± 21.92 mg/mL ve 354.0 ± 5.66 mg/mL kuru madde içerdiği saptandı ($p > 0.05$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının kuru madde miktarları. Standart sapma değerleri ($\pm$) ağırlık değerlerinin yanında belirtildi.

Ekstraktlar	Kuru Ağırlık (mg/mL)
PVE	329.0 ± 4.24
PVD	240.5 ± 13.44
ACE	382.5 ± 21.92
ACD	354.0 ± 5.66

4.2. Ekstraktların pH değerleri

Fıstık ve ananas kabuklarının etanol ve su ekstraktlarına ait pH değerleri Çizelge 4.2’de belirtildiği gibidir. Fıstık kabuğu etanol ekstraktının (PVE) pH değeri 5.44 ± 0.03 , su ekstraktının (PVD) pH değeri ise 5.32 ± 0.05 olarak belirlendi ($p > 0.05$). Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının pH değerlerinin ise, sırasıyla 3.63 ± 0.02 ve 3.70 ± 0.03 olduğu saptandı ($p > 0.05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: Ekstraktların pH değerleri. Standart sapma değerleri ($\pm$) pH değerlerinin yanında belirtildi. Belirtilen değerler en az üç bağımsız ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktlardan elde edildi.

Ekstraktlar	pH Değerleri
PVE	5.44 $\pm$ 0.03
PVD	5.32 $\pm$ 0.05
ACE	3.63 $\pm$ 0.02
ACD	3.70 $\pm$ 0.03

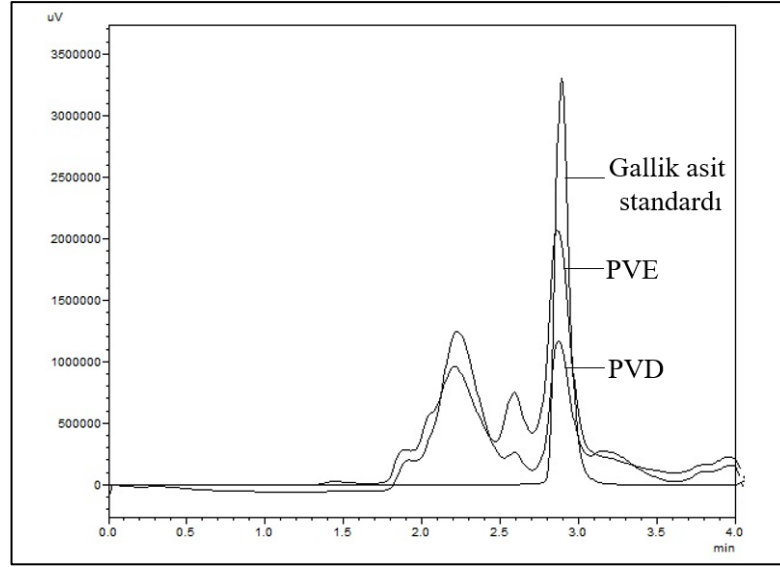
4.3. Ekstraktların fitokimyasal içerikleri

4.3.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriği

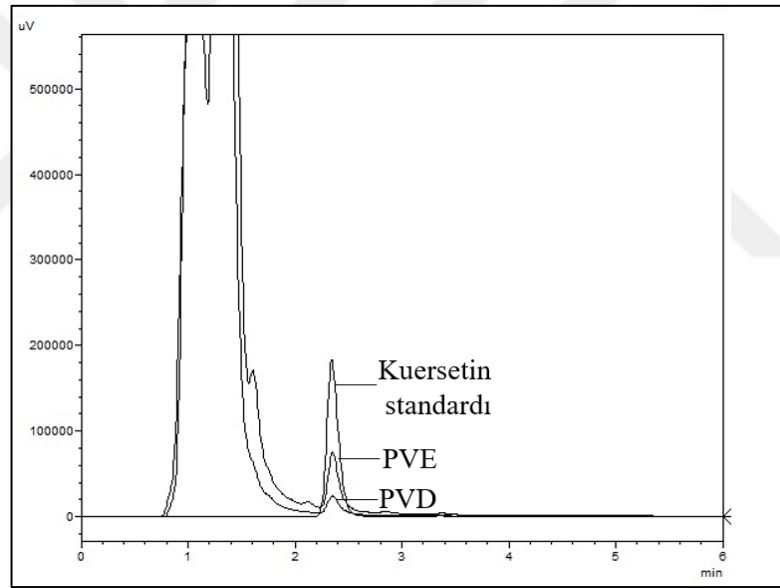
Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının fitokimyasal içerikleri Çizelge 4.3'te belirtildiği gibidir. PVE ve PVD ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla 23.3 $\pm$ 2.63 mg GAE/g ve 14.7 $\pm$ 1.45 mg GAE/g olarak belirlendi ($p < 0.05$). PVE ekstraktının içerdiği gallik asit miktarı 1.9 $\pm$ 0.36 mg/g iken, PVD ekstraktının içerdiği gallik asit miktarı 1.5 $\pm$ 0.01 mg/g olarak saptandı ($p > 0.05$) (Şekil 4.1). Toplam flavonoid içeriği PVE ekstraktı için 5.0 $\pm$ 0.54 mg KE/g iken, PVD ekstraktı için 2.9 $\pm$ 0.00 mg KE/g olduğu ölçüldü ($p < 0.05$). Kuersetin miktarı PVE ekstraktında 0.025 $\pm$ 0.001 mg/g, PVD ekstraktında 0.009 $\pm$ 0.001 mg/g olarak belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.2). Ekstraktların şeker içerikleri, HPLC analizleri ile değerlendirildi. PVE ekstraktı 10.5 $\pm$ 1.0 mg/g ekstrakt fruktoz, 8.5 $\pm$ 0.3 mg/g ekstrakt glukoz ve 29.5 $\pm$ 2.1 mg/g ekstrakt sükroz içerirken; PVD ekstraktı 10.6 $\pm$ 1.0 mg/g ekstrakt fruktoz, 8.6 $\pm$ 2.0 mg/g ekstrakt glukoz ve 30.3 $\pm$ 3.0 mg/g ekstrakt sükroz içermektedir. Sonuç olarak PVE ve PVD ekstraktları sırasıyla 48.5 $\pm$ 5.0 mg/g ekstrakt ve 49.5 $\pm$ 3.0 mg/g ekstrakt toplam şeker içerdiği belirlendi ($p > 0.05$). Toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerinin PVE ekstraktında fazla olması nedeni ile hizmet alımı ile Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda PVE ekstraktında bulunan bileşikler ve miktarları (kateşin: 0.250 mg/g, kafeik asit: 0.027 mg/g, epikateşin: 0.712 mg/g, p-kumarik asit: 0.048 mg/g ve ellajik asit: 0.322 mg/g) HPLC analizleri ile belirlendi (Şekil 4.3).

Çizelge 4.3: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE/g), toplam flavonoid (mg KE/g), gallik asit (mg/g ekstrakt) ve kuersetin (mg/g ekstrakt) ve toplam şeker (mg/g ekstrakt) miktarları. Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarıdır. Standart sapma ($\pm$) ve *p* değerleri çizelge içerisinde belirtildi.

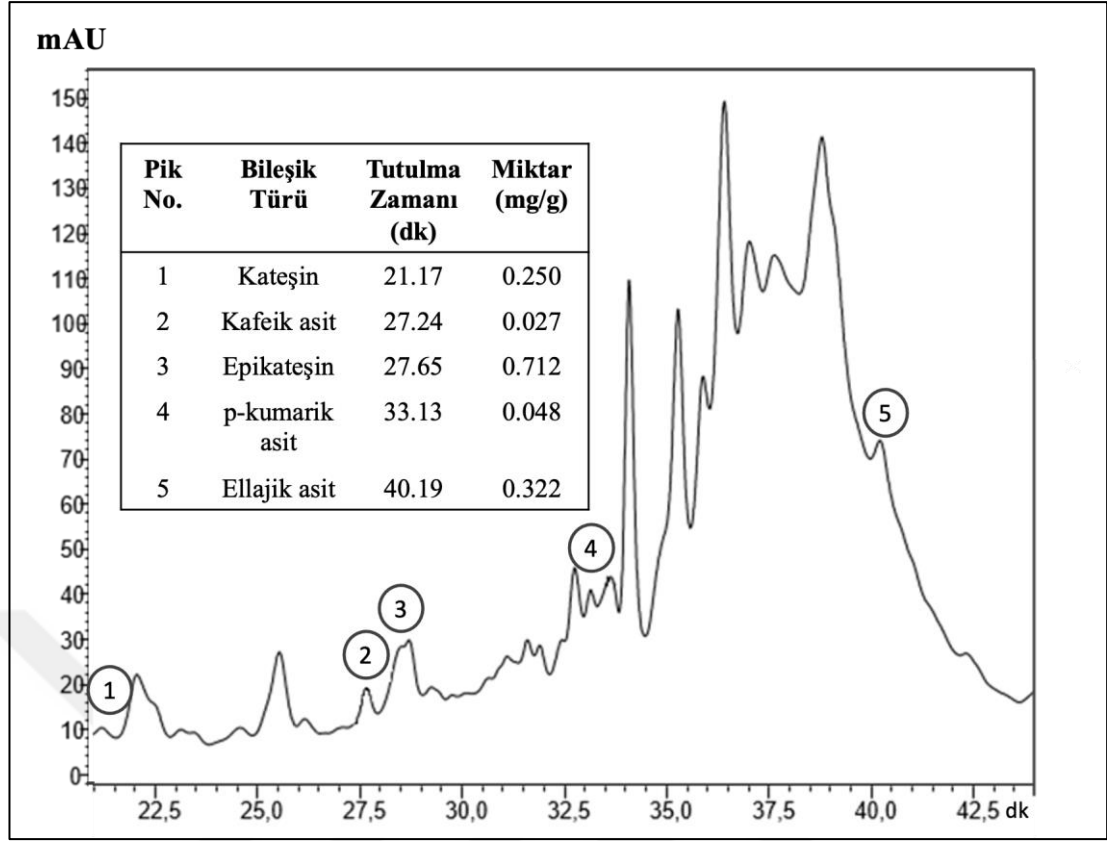
Kimyasal İçerik	Ekstraktlar		<i>p</i> değeri
	PVE	PVD	
Toplam Fenolik Bileşik	23.3 $\pm$ 2.63	14.7 $\pm$ 1.45	0.001
Toplam Flavonoid Bileşik	5.0 $\pm$ 0.54	2.9 $\pm$ 0.00	0.003
Gallik asit	1.9 $\pm$ 0.36	1.5 $\pm$ 0.01	0.118
Kuersetin	0.025 $\pm$ 0.01	0.009 $\pm$ 0.01	0.028
Fruktoz	10.5 $\pm$ 1.0	10.6 $\pm$ 1.0	0.092
Glukoz	8.5 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 2.0	0.479
Sükroz	29.5 $\pm$ 2.1	30.3 $\pm$ 3.0	0.142
Toplam Şeker	48.5 $\pm$ 5.0	49.5 $\pm$ 3.0	0.003



Şekil 4.1: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarına ait gallik asit içeriklerini gösteren HPLC kromatogramı.



Şekil 4.2: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarına ait kuersetin içeriklerini gösteren HPLC kromatogramı.



Şekil 4.3: PVE ekstraktına ait kateşin (1), kafeik asit (2), epikateşin (3), p-kumarik asit (4) ve ellajik asit (5) içeriklerini ($\mu\text{g/g}$) ve bu içeriklerin tutulma zamanlarını (dk) gösteren HPLC kromatogramı.

HPLC analizlerine ek olarak biyokimyasal testler aracılığı ile PVE ve PVD ekstraktlarında kinon, kumarin ve tanin bileşiklerinin varlığı tespit edildi. PVE ekstraktında ayrıca saponin bulunduğu da saptandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarında bulunan diğer bazı fitokimyasal bileşikler. Bileşiklerin varlığı ve yokluğu (+) ve (-) işaretleri ile belirtildi.

Ekstraktlar	Kinon	Kumarin	Tanin	Saponin
PVE	+	+	+	+
PVD	+	+	+	-

4.3.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriği

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının fitokimyasal içerikleri Çizelge 4.5'te belirtildiği gibidir. ACE ve ACD ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla, 1.7 ± 0.2 mg GAE/g ve 1.4 ± 0.4 mg GAE/g olarak saptandı ($p > 0.05$). Ananas ekstraktlarının askorbik asit içerikleri ACE ve ACD için sırasıyla 11.6 ± 3.7 mg/g ekstrakt ve 11.2 ± 1.1 mg/g ekstrakt olarak belirlendi ($p > 0.05$).

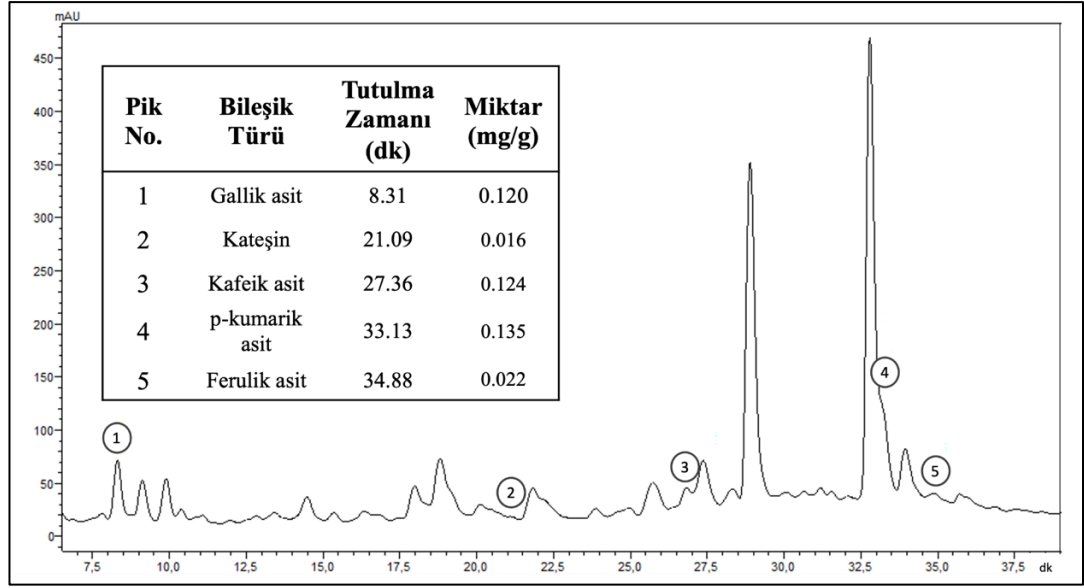
Ekstraktların şeker içerikleri HPLC analizleri ile değerlendirildi. Fruktoz, glukoz ve sükroz miktarları ölçüldü ve toplam şeker içerikleri hesaplandı. ACE ekstraktı 87.2 ± 5.0 mg/g ekstrakt fruktoz, 129.8 ± 20.0 mg/g ekstrakt glukoz ve 58.5 ± 5.0 mg/g ekstrakt sükroz içerirken; ACD ekstraktı 131.9 ± 8.4 mg/g fruktoz, 160.6 ± 13.8 mg/g ekstrakt glukoz ve 37.6 ± 3.4 mg/g ekstrakt sükroz içerdi. Sonuç olarak ACE ve ACD ekstraktlarının sırasıyla 275.5 ± 18.0 mg/g ve 330.1 ± 13.0 mg/g ekstrakt toplam şeker içerdiği belirlendi ($p < 0.1$). Toplam fenolik madde içeriğinin ACE ekstraktında fazla olması nedeni ile hizmet alımı ile Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda ACE ekstraktında bulunan bileşikler ve miktarları (gallik asit: 0.120 mg/g, kateşin: 0.016 mg/g, kafeik asit: 0.124 mg/g, p-kumarik asit: 0.135 mg/g ve ferulik asit: 0.022 mg/g) HPLC analizleri ile belirlendi (Şekil 4.4).

Çizelge 4.5: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE/g), gallik asit (mg/g ekstrakt), kuersetin (mg/g ekstrakt), askorbik asit (mg/g ekstrakt) ve toplam şeker (mg/g ekstrakt) miktarları. Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarıdır. Standart sapma ($\pm$) ve p değerleri çizelge içerisinde belirtildi.

Kimyasal İçerik	Ekstraktlar		
	ACE	ACD	p değeri
Toplam Fenolik Bileşik	1.7 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.4	0.118
Askorbik Asit	11.6 $\pm$ 3.7	11.2 $\pm$ 1.1	0.405
Fruktoz	87.2 $\pm$ 5.0	131.9 $\pm$ 8.4	0.020
Glukoz	129.8 $\pm$ 20	160.6 $\pm$ 13.8	0.130
Sükroz	58.5 $\pm$ 5.0	37.6 $\pm$ 3.4	0.000
Toplam Şeker	275.5 $\pm$ 18.0	330.1 $\pm$ 13.0	0.090

Çizelge 4.6: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarında bulunan diğer fitokimyasal bileşikler. Bileşiklerin varlığı ve yokluğu (+) ve (-) işaretleri ile belirtildi.

Ekstraktlar	Kinon	Kumarin	Tanin	Saponin
ACE	+	+	-	-
ACD	+	+	-	-



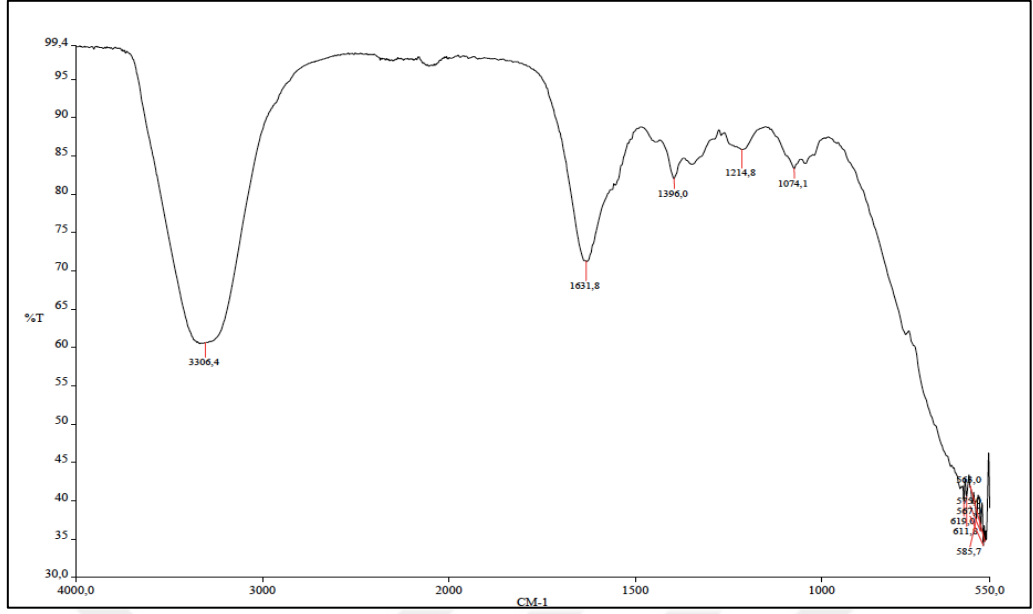
Şekil 4.4: Ananas kabuğu etanol ekstraktına (ACE) ait gallik asit (1), kateşin (2), kateşin (3), p-kumarik asit (4) ve ferulik asit (5) içerikleri (mg/g) ve bu içeriklerin tutulma zamanlarını (dk) gösteren HPLC kromatogramı.

4.4. Ekstraktların içerdiği fonksiyonel grupların Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmesi

FT-IR spektrası, bir materyalde bulunan organik fonksiyonel grupları ve materyalin yapısal özelliklerini belirlemede kullanılan bir analitik yöntemdir. 600-500 nm dalga boyu arası ilgili materyale özgü bileşik gruplarına, pozisyon ve bant yoğunluğunun ilgili materyale spesifik olması nedeniyle parmakizi moleküller olarak adlandırılır [Matinise et al., 2017].

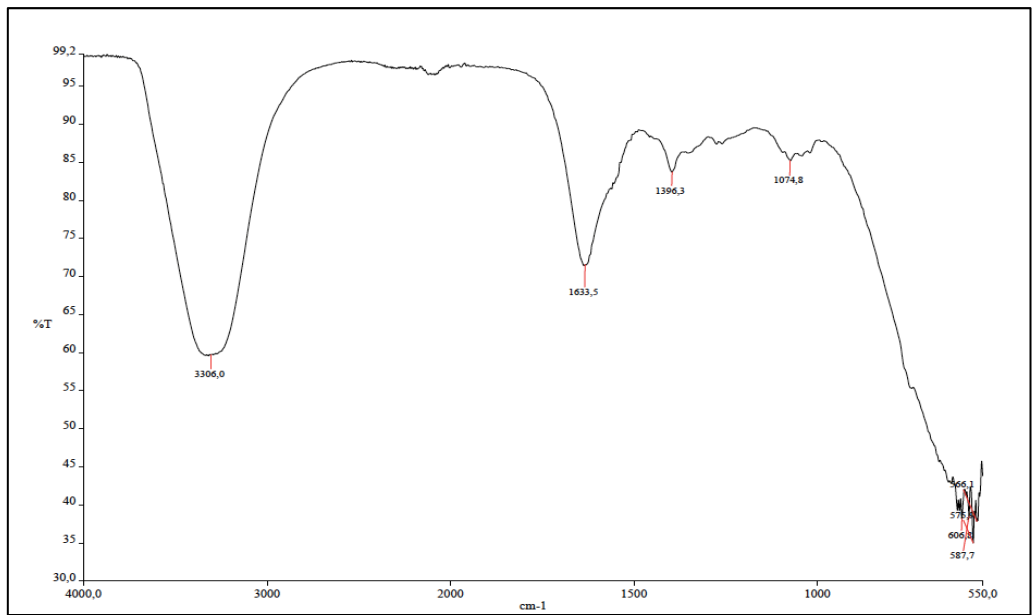
4.4.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının FT-IR analizleri

Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı (PVE) 4000-550 cm^{-1} arası taranan kızılötesi spektrası belirlendi. 3306 cm^{-1} 'de fenolik bileşiklerin ve alkollerin varlığını işaret eden [Demiral et al., 2008] -OH yapısından kaynaklı gerilme titreşim piki gözlenmektedir [Çelekli et al., 2010]. 1631 cm^{-1} 'deki pikte ise C=C gruplarının varlığı ile konjuge alkenler ve aromatik bileşiklerin bulunduğunu göstermektedir [Haq, 2021]. 1396 cm^{-1} 'de pik oluşturan N-H gruplarının varlığı aminlerin veya amidlerin, 1074 cm^{-1} 'de C-O gruplarının varlığı eter, alkol ve ester varlığına işaret etmektedir [Özay, 2014] (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktına (PVE) ait FT-IR spektrası.

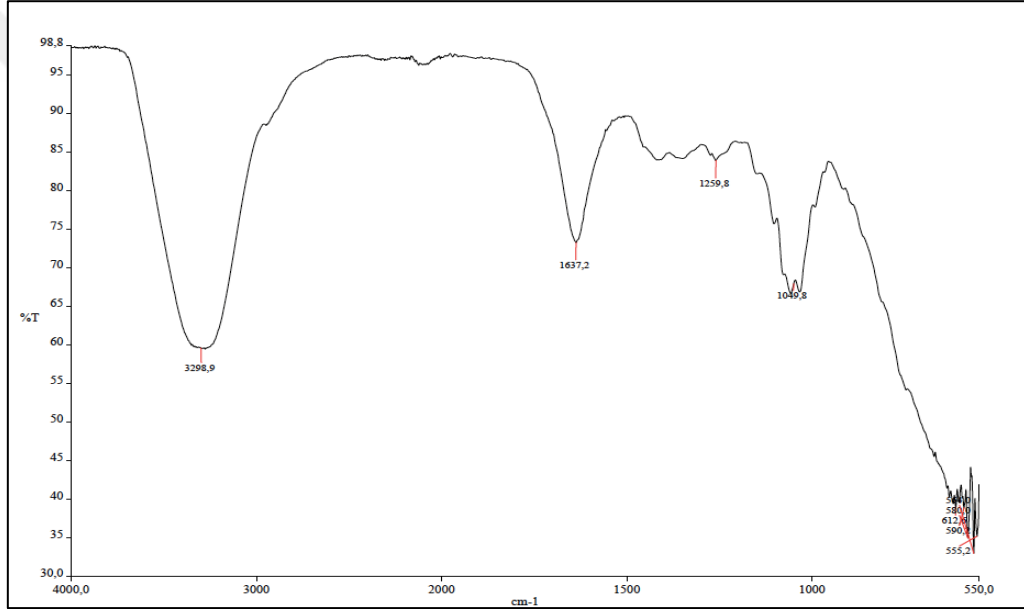
Fıstık dış pembe kabuğu su ekstraktı (PVD) 4000-550 cm^{-1} arası taranan kızılötesi spektrası belirlendi. 3306 cm^{-1} 'de fenolik bileşiklerin ve alkollerin varlığını işaret eden [Demiral et al., 2008] -OH yapısından kaynaklı gerilme titreşim piki gözlenmektedir [Çelekli et al., 2010]. 1633 cm^{-1} 'deki pikte ise C=C gruplarının varlığı ile konjuge alkenler içerdiğini göstermektedir. 1396 cm^{-1} 'de pik oluşturan N-H gruplarının varlığı aminlerin veya amidlerin, 1074 cm^{-1} 'de C-O gruplarının varlığı eter, alkol ve ester varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Fıstık dış pembe kabuğu su ekstraktına (PVD) ait FT-IR spektrası.

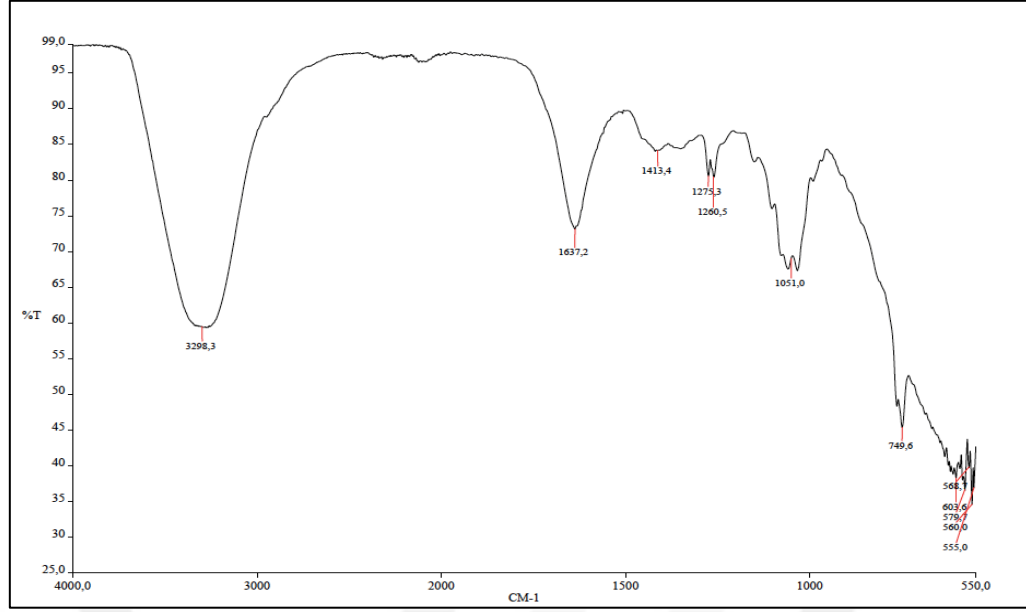
4.4.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının FT-IR analizleri

Ananas kabuğu etanol ekstraktı (ACE) 4000-550 cm^{-1} arası taranan kızılötesi spektrası belirlendi. 3298 cm^{-1} 'de fenolik bileşiklerin ve alkollerin varlığını işaret eden [Demiral et al., 2008]. -OH yapısından kaynaklı gerilme titreşim piki gözlenmektedir [Çelekli et al., 2010]. 1637 cm^{-1} 'deki pikte ise C=C gruplarının varlığı ile konjuge alkenler ve aromatik bileşiklerin [Haque, 2021] bulunduğunu göstermektedir. 1259 cm^{-1} 'de pik oluşturan C-O gruplarının varlığı konjuge olmayan alkenlerin, 1049 cm^{-1} 'de C-O gruplarının varlığı eter, alkol ve ester varlığına işaret etmektedir [Özay, 2014] (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Ananas kabuğu etanol ekstraktına (ACE) ait FT-IR spektrası.

Ananas kabuğu su ekstraktı (ACD) 4000-550 cm^{-1} arası taranan kızılötesi spektrası belirlendi. 3298 cm^{-1} 'de fenolik bileşiklerin ve alkollerin varlığını işaret eden [Demiral et al., 2008] -OH yapısından kaynaklı gerilme titreşim piki gözlenmektedir [Çelekli et al., 2010]. 1637 cm^{-1} 'deki pikte ise C=C gruplarının varlığı ile konjuge alkenler, aromatik bileşikler [Haque, 2021] içerdiğini göstermektedir. 1259 cm^{-1} 'de pik oluşturan C-O gruplarının varlığı konjuge olmayan alkenlerin, 1049 cm^{-1} 'de C-O gruplarının varlığı eter, alkol ve ester varlığına işaret etmektedir [Özay, 2014]. 749 cm^{-1} 'de C-H gruplarının varlığı aromatik bileşiklerin varlığına işaret eder (Wang et al., 2023) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Ananas su ekstraktına (ACD) ait FT-IR spektrası.

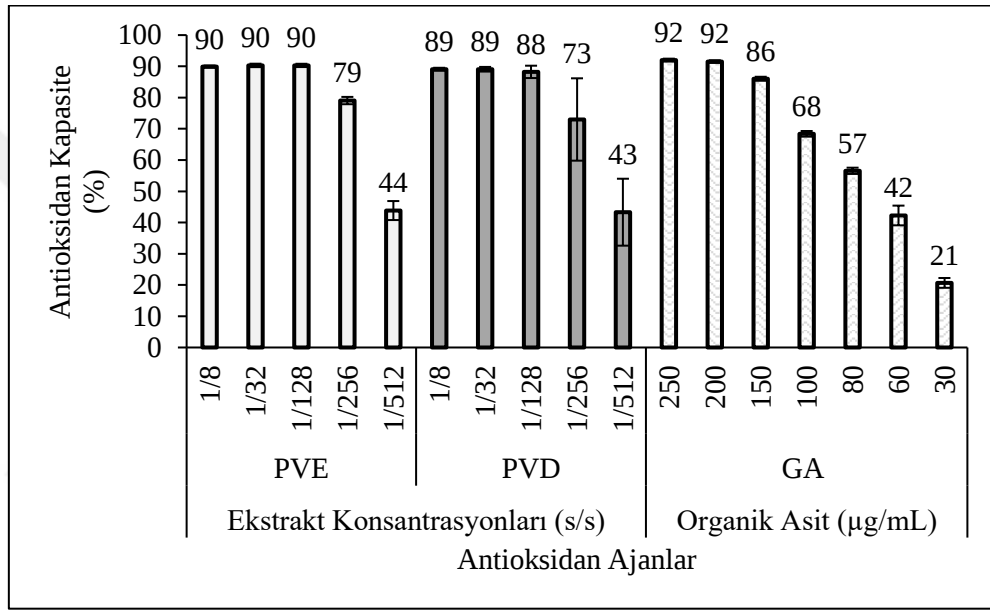
4.5. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri

4.5.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, DPPH radikalini yüzde süpürülme oranı baz alınarak değerlendirildi (Şekil 4.9). Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktları için gallik asit (30-250 µg/mL) kontrol antioksidatif bileşik olarak seçildi. Ham ekstraktların farklı seyreltme oranlarının DPPH radikalini %50 oranında süpürmesi için gereken ekstrakt konsantrasyonları (SC₅₀) Çizelge 4.7’de belirtildiği gibidir. Gallik asidin SC₅₀ değeri 0.07 mg/mL, PVE ekstraktının SC₅₀ değeri 0.63±0.01mg/mL ekstrakt ve PVD ekstraktının SC₅₀ değeri 0.56±0.01 mg/mL ekstrakt olarak belirlendi (p>0.05) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının DPPH süpürme etkisi (SC_{50}) (mg/mL). Belirtilen değerler en az üç farklı uygulamanın ortalama değerleridir. Standart sapma ($\pm$) ve p değerleri çizelgede belirtildi.

Ekstraktlar	SC_{50} (mg/mL)
PVE	0.63 ± 0.01
PVD	0.56 ± 0.01
p değeri	0.52



Şekil 4.9: Fıstık kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gallik asit (GA) farklı konsantrasyonlarının DPPH radikaline karşı antioksidan kapasiteleri (%). Belirtilen değerler en az üç farklı uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

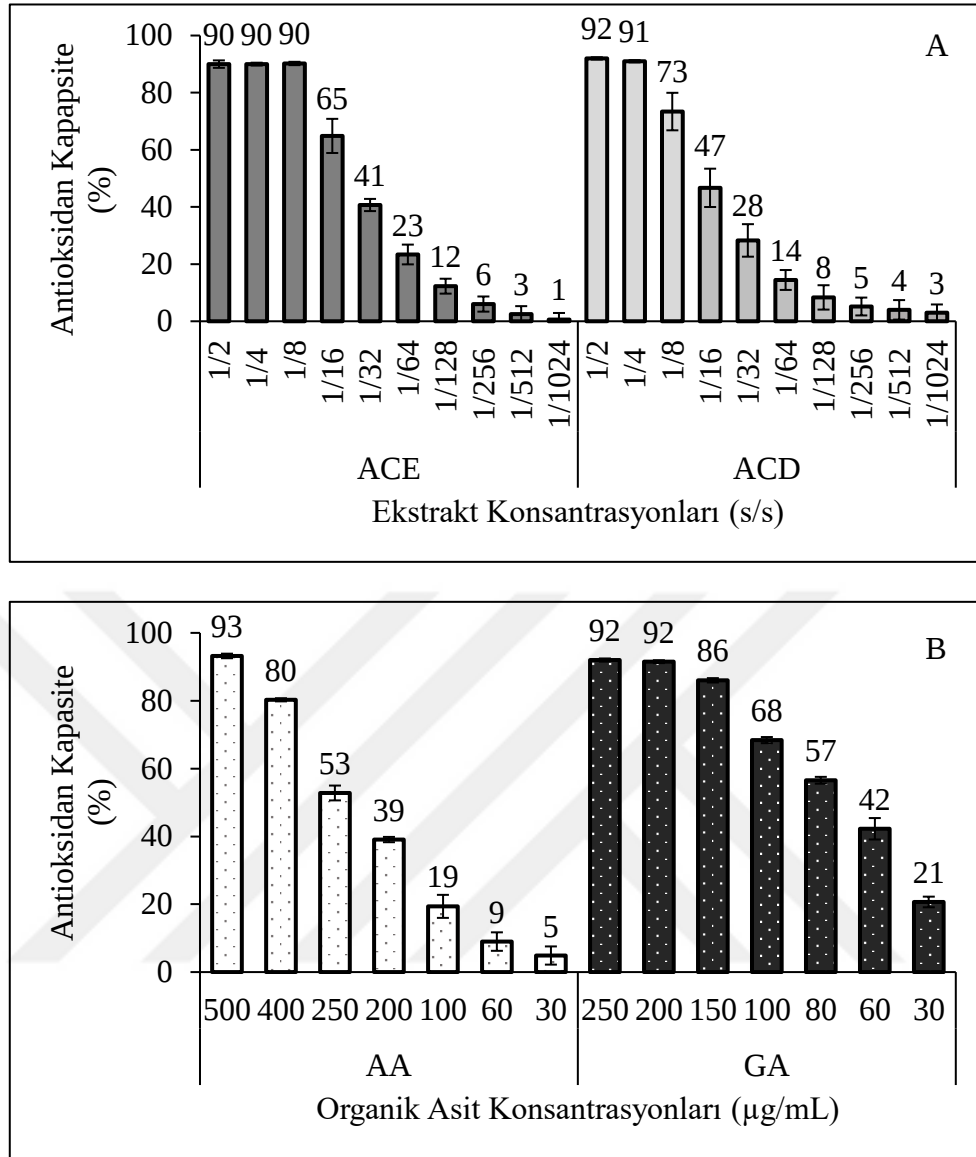
4.5.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, DPPH radikalinin yüzde süpürülme oranı baz alınarak değerlendirildi (Şekil 4.10). Ananas kabuğu ekstraktları için gallik asit (30-250 $\mu\text{g/mL}$) ve askorbik asit (30-500 $\mu\text{g/mL}$) kontrol antioksidatif bileşik olarak seçildi. Ham ekstraktların farklı seyreltme oranlarının DPPH radikalini %50 oranında süpürmesi için gereken ekstrakt konsantrasyonları (SC_{50}) Çizelge 4.8’de belirtildiği gibidir. Askorbik asidin SC_{50} değeri 0.1 ± 0.00 mg/mL, gallik asidin SC_{50} değeri 0.07 mg/mL, ACE ekstraktının SC_{50}

değeri 27.19 ± 0.79 mg/mL ekstrakt ve ACD ekstraktının SC_{50} değeri 39.45 ± 2.4 mg/mL ekstrakt olarak belirlendi ($p < 0.05$) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının DPPH süpürme etkisi. (SC_{50}) (mg/mL). Belirtilen değerler en az üç farklı uygulamanın ortalama değerleridir. Standart sapma ($\pm$) ve p değerleri çizelgede belirtildi.

Ekstraktlar	SC_{50} (mg/mL)
ACE	27.19 ± 0.79
ACD	39.45 ± 2.4
p değeri	0.017



Şekil 4.10: Ananas kabuğu etanol (ACE) ile su (ACD) ekstraktları (A) ve askorbik asit (AA) ile gallik asidin (GA) (B) farklı konsantrasyonlarının DPPH radikaline karşı antioksidan kapasiteleri. Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.6. Ekstraktların antimikrobiyal etkinlikleri

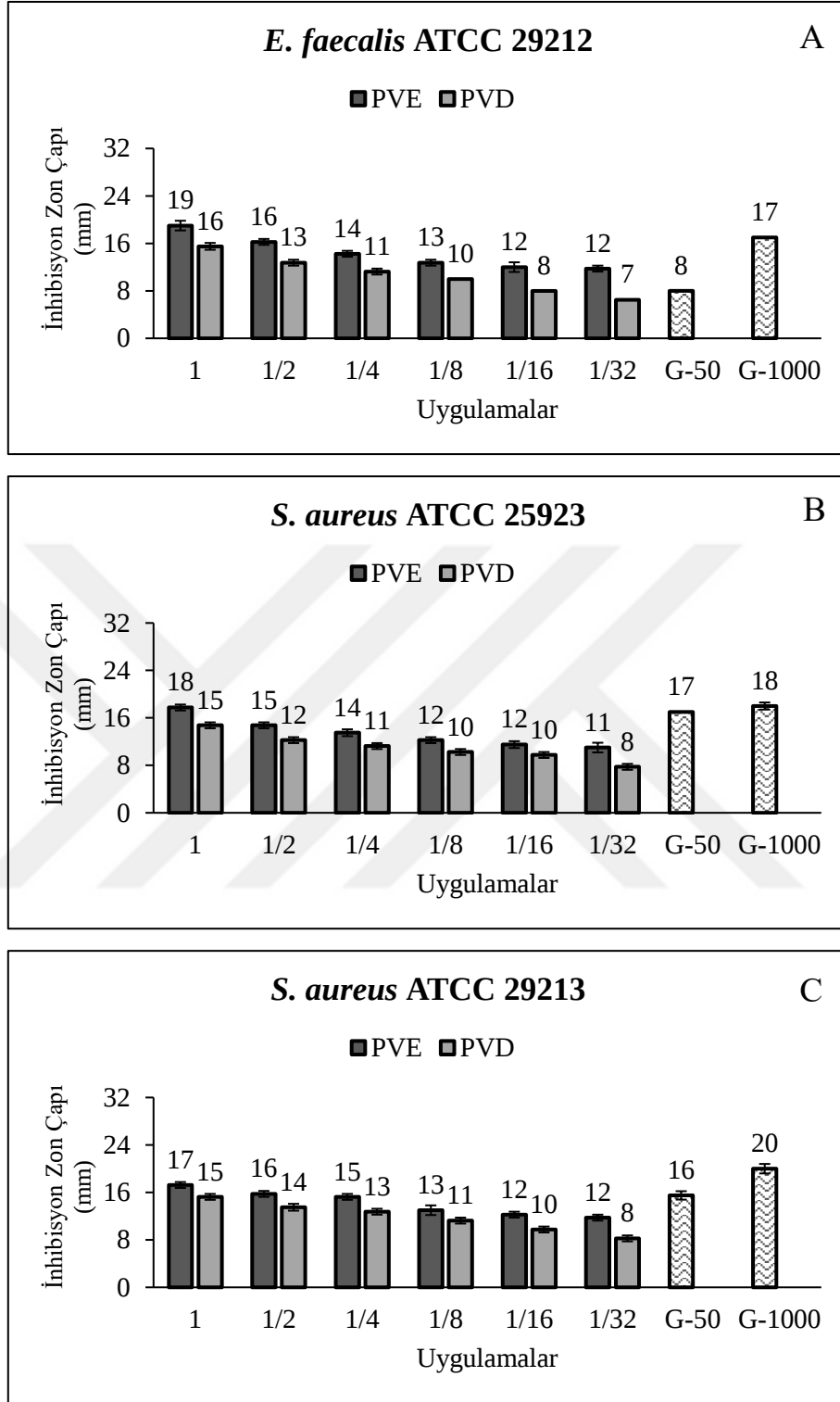
4.6.1. Ekstraktların agar kuyu difüzyonu ile antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi

4.6.1.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri

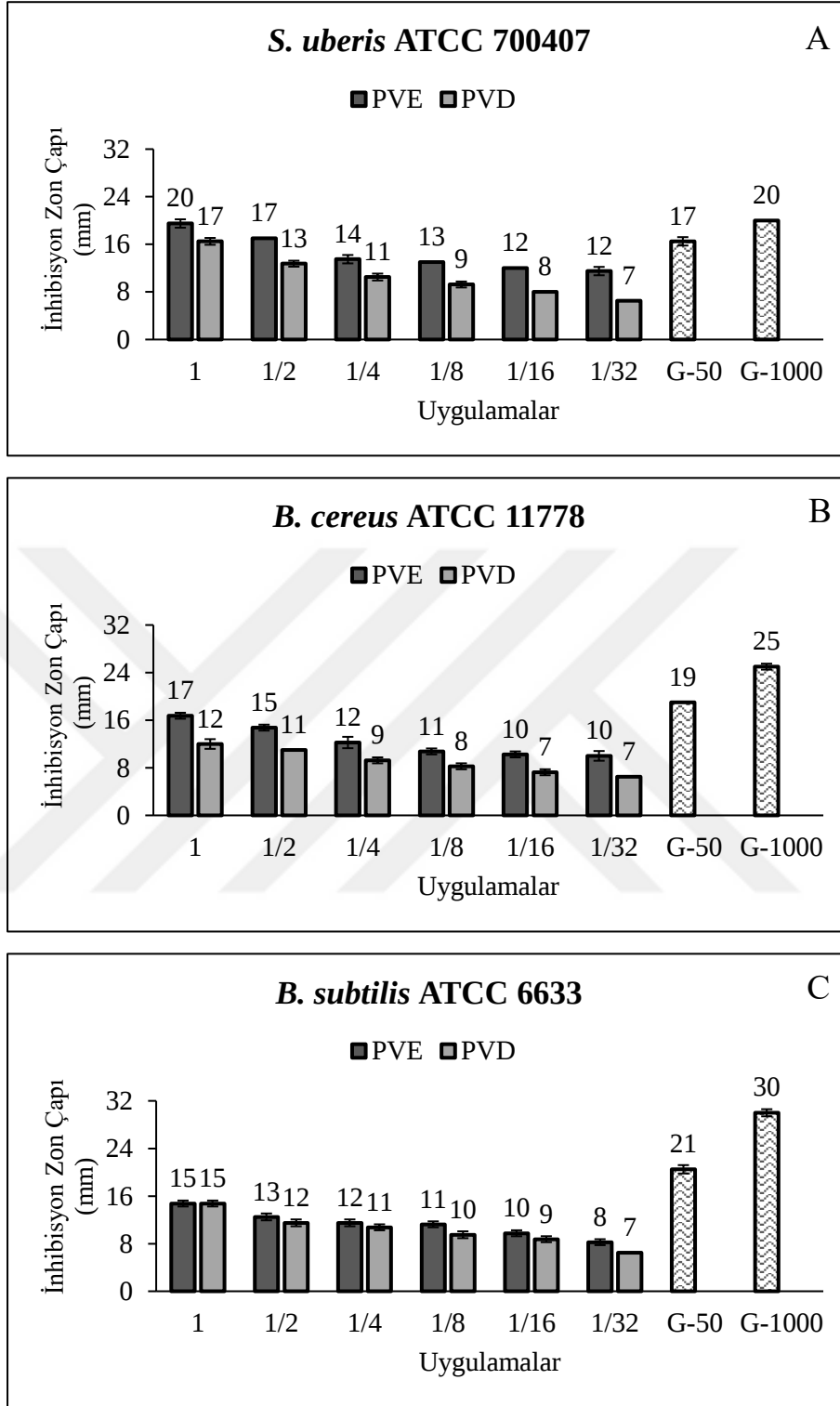
Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri ön çalışmalarla Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde test edildi. Bu çalışmalar sonucunda PVE ve PVD ekstraktlarının Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olmadığı görüldü. Bu nedenle çalışmada kullanılan Gram pozitif bakteriler olan *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşları, PVE ve PVD ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirmek amacıyla seçildi. Kuyu difüzyonu yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre, PVE ekstraktı uygulaması ile, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarını içeren MHA besiyeri üzerinde sırasıyla 19, 18, 17, 20, 17 ve 15 mm inhibisyon zon çapları olduğu görüldü (Şekil 4.11, Şekil 4.12). PVD ekstraktı uygulamasında ise, ilgili bakterilerde sırasıyla 16, 15, 15, 17, 12 ve 15 mm inhibisyon zon çapları olduğu belirlendi. PVE ekstraktının *B. subtilis* ATCC 6633 suşu hariç diğer tüm suşlar üzerinde, PVD ekstraktından daha etkili olduğu görüldü. Test bakterileri içerisinde PVE ve PVD ekstraktlarına karşı en yüksek hassasiyetin *S. uberis* ATCC 700407 suşunda olduğu saptandı. PVE ekstraktı ile en yüksek ve en düşük zon çapı sırasıyla *S. uberis* ATCC 700407 (20 ± 1 mm) ve *B. subtilis* ATCC 6633 (15 ± 1 mm) suşlarında elde edildi. Benzer şekilde PVD ekstraktı ile en yüksek ve en düşük zon çapı sırasıyla *S. uberis* ATCC 700407 (17 ± 1 mm) ve *B. cereus* ATCC 11778 (12 ± 1 mm) suşlarına karşı elde edildi. Ekstraktların antimikrobiyal etkinliğinin, ekstrakt konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin (50 µg/mL:G-50 ve 1000 µg/mL:G-1000) ve ekstrakt uygulamalarından elde edilen inhibisyon zon çapları karşılaştırıldı. PVE ekstraktının, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşları hariç diğer tüm bakterilerde G-50'den daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptandı. Ayrıca G-1000 kontrolü ile PVE ekstraktının antimikrobiyal etkinliği karşılaştırıldığında, PVE ekstraktının *E. faecalis*

ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşları için G-1000 kontrolünden daha etkili olduğu belirlendi.





Şekil 4.11: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1-1/32) ve gentamisin (G-50 ve G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm) (A: *E. faecalis* ATCC 29212, B: *S. aureus* ATCC 25923 ve C: *S. aureus* ATCC 29213). Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.12: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1-1/32) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm) (A: *S. uberis* ATCC 700407, B: *B. cereus* ATCC 11778 ve C: *B. subtilis* ATCC 6633). Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.6.1.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri

4.6.1.2.1. Ananas kabuğu ekstraktı eldesi için ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

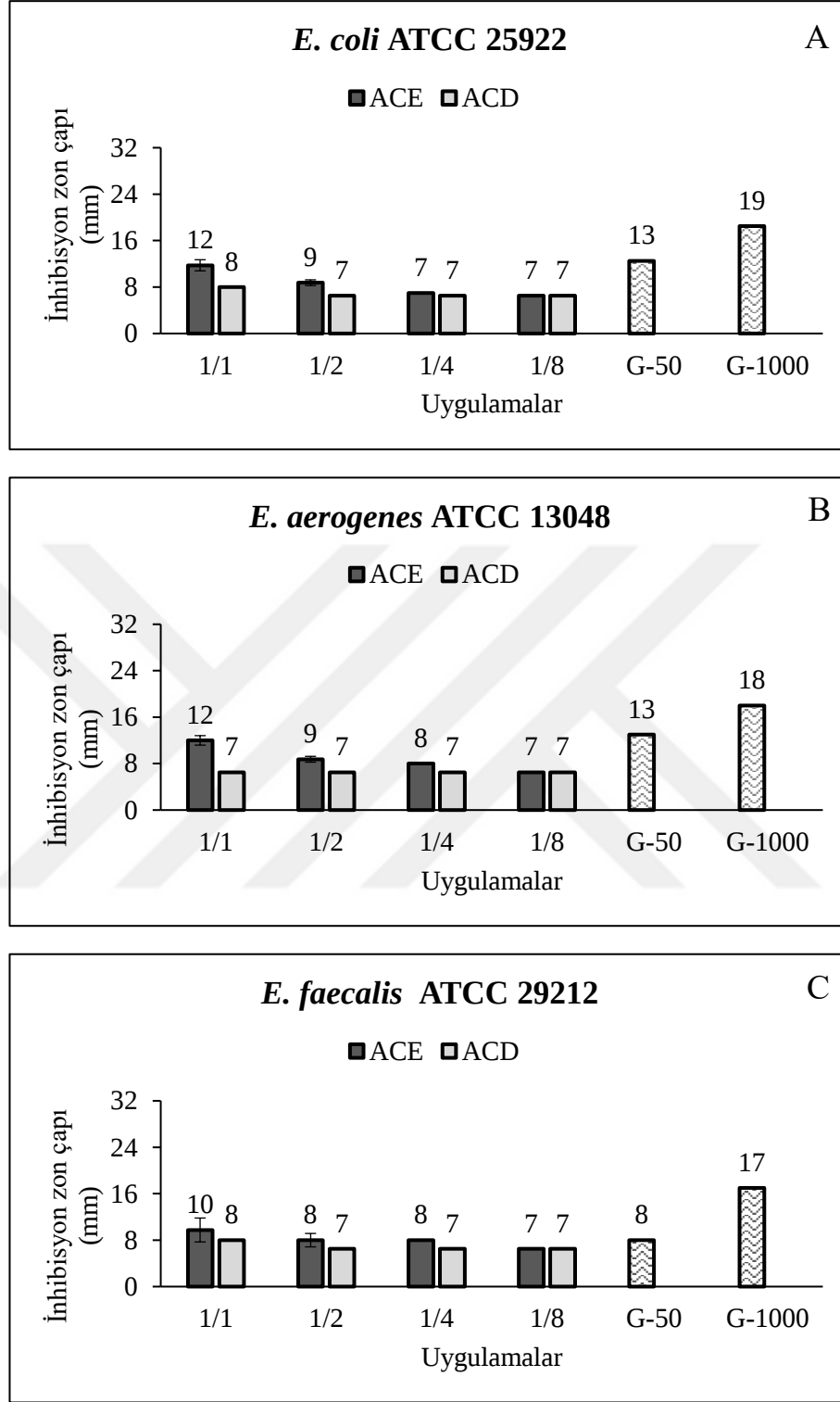
Farklı oranlarda organik çözücü (100 mL, %60 ve %80 (s/s) etanol) ve farklı miktarlarda ananas kabuğunu (10 g ve 20 g) farklı ön işlemlerden geçirerek elde edilen ekstraktların (ACE-1, ACE-2, ACE-3, ACE-4) çalışmada kullanılan test bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelenerek ananas kabuğu için tercih edilecek ekstraksiyon yöntemi belirlendi. En basit ekstraksiyon yöntemi olan ACE-1 ekstraktının sadece Gram pozitif test bakterilere (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633) karşı yüksek konsantrasyonlarda (1/1 ve 1/2 (s/s)) antimikrobiyal etki gösterdiği saptandı. Ananas kabuğu miktarı artırılarak hazırlanan ACE2 ekstraktı ile antimikrobiyal etki spektrumun biraz daha genişletildiği, *S. uberis* ATCC 700407 hariç tüm bakterilerde yüksek ekstrakt konsantrasyonunda inhibisyon belirlendiği görüldü. Önceki yönteme ek olarak oda sıcaklığında bir gece çalkalamalı inkübasyona maruz bırakılan ACE-3 ekstraktının, ACE-2 ekstraktından daha düşük konsantrasyonda tüm test bakterilerinde antimikrobiyal etki gösterdiği görüldü. Son olarak Gram pozitif, Gram negatif veya her iki gruptan bakteriler üzerinde etki etmesi hedeflenerek etanol konsantrasyonu %80 (s/s) olan ACE-4 ekstraktının en etkili yöntem olduğu belirlendi. Aynı anda Gram pozitif ve Gram negatif test bakterileri üzerinde düşük konsantrasyonlarda (1/8 (s/s)) dahi inhibisyona neden olduğu saptandı (Çizelge 4.9). Bu ön denemenin sonunda çalışma boyunca ananas kabuğu ekstraksiyon yöntemi kararlaştırıldı. Ananas kabuğu etanol ekstraktı ACE, su ekstraktı ACD olarak ifade edildi.

Çizelge 4.9: Ananas kabuğu etanol ekstraktlarının (ACE-1, ACE-2, ACE-3, ACE-4) farklı konsantrasyonlarının (1-1/8) test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm) (EC: *E. coli* ATCC 25922, EA: *E. aerogenes* ATCC 13408, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, SA 25923: *S. aureus* ATCC 25923, SA 29213: *S. aureus* ATCC 29213, PA: *P. aeruginosa* ATCC 27853, SU: *S. uberis* ATCC 700407, BC: *B. cereus* ATCC 11778 ve BS: *B. subtilis* ATCC 6633). Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama ve standart sapmalarına aittir.

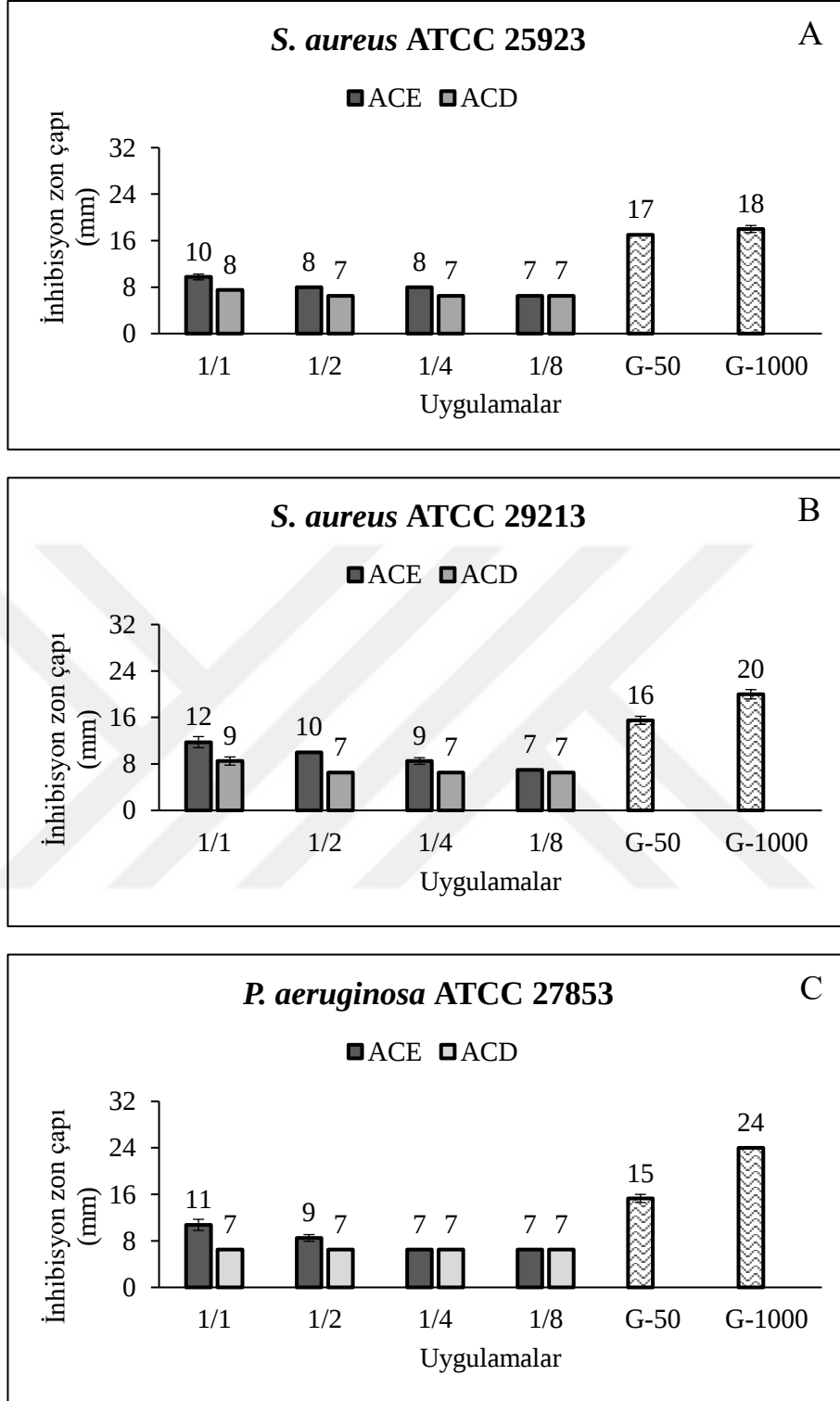
		İnhibisyon Zon Çapları (mm)			
		Ekstrakt Konsantrasyonları (s/s)			
Ekstraktlar	Suşlar	1/1	1/2	1/4	1/8
ACE-1	EC	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	EA	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	EF	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SA 25923	9.5±0.7	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SA 29213	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	PA	8.5±2.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SU	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	BC	9.5±0.7	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	BS	8.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
ACE-2	EC	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	EA	9.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	EF	9.0±0.0	8.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	SA 25923	10.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SA 29213	8.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	PA	9.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SU	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	BC	10.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	BS	11.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
ACE-3	EC	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	EA	7.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	EF	11.0±0.0	9.5±0.7	8.0±0.0	0.0±0.0
	SA 25923	10.0±0.0	9.0±0.0	8.0±0.0	0.0±0.0
	SA 29213	10.5±0.7	10.0±0.0	8.5±0.7	7.0±0.0
	PA	10.0±0.0	8.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SU	7.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	BC	12.0±0.0	9.5±0.7	8.0±0.0	7.0±0.0
	BS	10.0±0.7	9.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0
ACE-4	EC	11.0±0.0	8.5±0.7	7.0±0.0	0.0±0.0
	EA	12.5±0.7	8.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	EF	11.5±0.7	9.0±0.0	8.0±0.0	0.0±0.0
	SA 25923	10.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	0.0±0.0
	SA 29213	11.5±0.7	10.0±0.0	8.5±0.7	7.0±0.0
	PA	10.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	SU	11.0±1.4	9.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	BC	11.5±0.7	9.0±0.0	8.0±0.0	7.0±0.0
	BS	10.0±0.0	9.0±0.7	7.0±0.0	0.0±0.0

4.6.1.2.2. Ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri

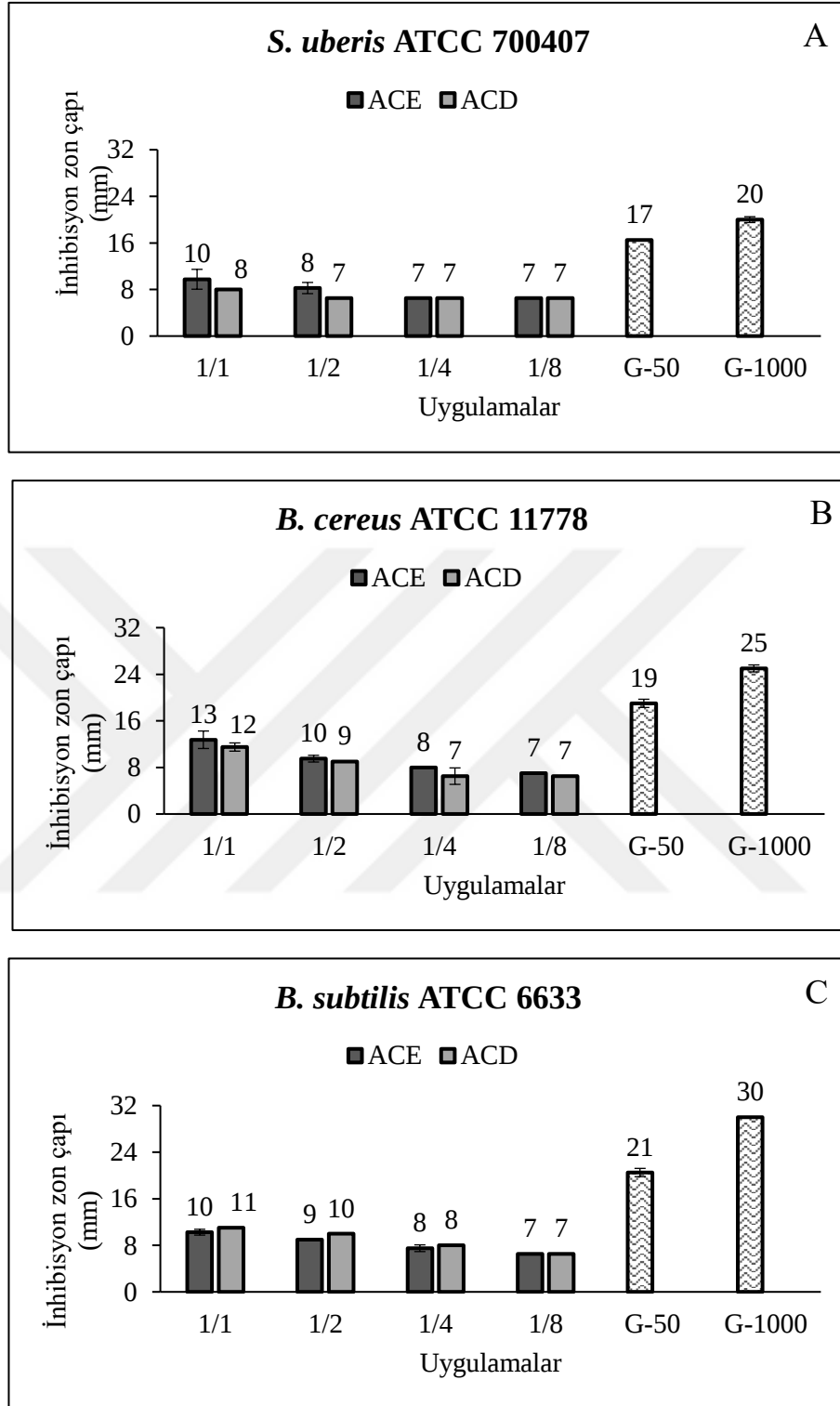
Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri ön çalışmalarla Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde test edildi. Bu çalışmalar sonucunda ACE ve ACD ekstraktlarının Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olduğu görüldü. Kuyu difüzyonu yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre, ACE ekstraktı uygulaması ile, *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13408, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarını içeren MHA besiyeri üzerinde sırasıyla 12, 12, 10, 10, 12, 11,10, 13 ve 10 mm inhibisyon zon çapları olduğu saptandı (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15). ACD ekstraktı uygulamasında ise, ilgili bakterilerde sırasıyla 8, 7, 8, 8, 9, 7, 8, 12 ve 11 mm inhibisyon zon çapları olduğu belirlendi. İnhibisyon zon çapı ölçümleri karşılaştırıldığında *B. subtilis* ATCC 6633 suşu hariç tüm diğer suşlarına karşı ACE ekstraktının ACD ekstraktından daha etkili olduğu belirlendi. En yüksek inhibisyon zon çapının ACE ve ACD ekstraktları ile *B. cereus* ATCC 11778 suşuna karşı elde edildiği saptandı (sırasıyla 13 ve 12 mm). En düşük inhibisyon zon çapının ise ACE ekstraktı ile *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. uberis* ATCC 700407 suşlarına karşı (10 mm); ACD ekstraktı ile ise *E. aerogenes* ATCC 13408 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına (7 mm) karşı elde edildiği belirlendi. Ekstraktların antimikrobiyal etkinliğinin, ekstrakt konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin (50 µg/mL:G-50 ve 1000 µg/mL:G-1000) ve ekstrakt uygulamalarından elde edilen inhibisyon zon çapları karşılaştırıldı. Gentamisin uygulamaları (G-50 ve G-1000) ile ananas kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırıldığında, yalnızca *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun ACE uygulamasının (10 mm) G-50 kontrolünden (8 mm) daha yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğu, ACD uygulamasının (8 mm) ise G-50 kontrolü ile eşit inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirlendi.



Şekil 4.13: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1-1/8) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm), (A: *E. coli* ATCC 25922, B: *E. aerogenes* ATCC 13408 ve C: *E. faecalis* ATCC 29212). Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.14: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1-1/8) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm), (A: *S. aureus* ATCC 25923, B: *S. aureus* ATCC 29213 ve C: *P. aeruginosa* ATCC 27853). Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.15: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1-1/8) ve gentamisin (G-50, G-1000) uygulamalarının test bakterileri üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm), (A: *S. uberis* ATCC 700407, C: *B. cereus* ATCC 11778 ve C: *B. subtilis* ATCC 6633). Belirtilen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalama değerleridir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.6.2. Ekstraktların minimal inhibisyon ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi

4.6.2.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının minimal inhibisyon ve minimal bakterisidal konsantrasyonları

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) mikrotitrasyon plakasında dilüsyon metodu ile belirlendi. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının (PVE ve PVD) MİK ve MBK değerleri sırasıyla 0.8-99.1mg/mL ekstrakt ve 1.3-150.0 mg/mL ekstrakt olarak saptandı (Çizelge 4.10). Test edilen Gram pozitif bakteriler arasında PVE ekstraktının en yüksek etki ettiği bakterinin *S. uberis* ATCC 700407 suşu olduğu görüldü. PVE ve PVD ekstraktlarının bu suş üzerinde MİK değerleri sırasıyla 0.8 mg/mL ekstrakt ve 11.1 mg/mL ekstrakt; MBK değerleri ise sırasıyla 1.3 mg/mL ekstrakt ve 15.7 mg/mL ekstrakt olduğu belirlendi.

Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının en zayıf antimikrobiyal etki gösterdiği bakteriler ise; PVE ekstraktı için 49.0 mg/mL ekstrakt (MİK) ve 99.0 mg/mL ekstrakt (MBK) değerleri ile *B. subtilis* ATCC 6633 suşu olarak belirlendi. PVD ekstraktı için ise 82.5 mg/mL ekstrakt MİK değeri ve 150.0 mg/g ekstrakt MBK değeri ile *B. cereus* ATCC 11788 suşu olduğu görüldü.

Çizelge 4.10: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerine karşı belirlenen minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal (MBK) konsantrasyonları (mg/mL). Belirlenen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına ve standart sapmalarına ($\pm$) aittir.

Test Bakterileri	Ekstraktlar			
	PVE		PVD	
	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1.0 $\pm$ 0.02	1.4 $\pm$ 0.07	9.6 $\pm$ 0.22	15.5 $\pm$ 1.24
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35.9 $\pm$ 0.91	55.3 $\pm$ 5.03	24.2 $\pm$ 0.13	36.7 $\pm$ 0.78
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	22.6 $\pm$ 0.06	39.3 $\pm$ 0.98	25.6 $\pm$ 0.24	39.1 $\pm$ 1.13
<i>S. uberis</i> ATCC 700407	0.8 $\pm$ 0.01	1.3 $\pm$ 0.08	11.1 $\pm$ 0.02	15.7 $\pm$ 0.12
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	25.6 $\pm$ 0.54	38.9 $\pm$ 4.81	82.5 $\pm$ 0.76	150.0 $\pm$ 15.17
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	49.0 $\pm$ 0.80	99.1 $\pm$ 9.40	27.3 $\pm$ 0.63	42.2 $\pm$ 1.96

4.6.2.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının minimal inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) mikrotitrasyon plakasında dilüsyon metodu ile belirlendi. Ananas kabuğu ekstraktlarından, ACD ekstraktının MİK ve MBK değerleri sırasıyla 36.7-151.8 mg/mL ekstrakt ve 39.6-197.3 mg/mL ekstrakt olarak saptandı (Çizelge 4.10). İncelenen suşlar arasında ACE ekstraktının en yüksek etki ettiği bakterinin *S. aureus* ATCC 29213 suşu olduğu görüldü. *S. aureus* ATCC 29213 suşuna karşı ACE ekstraktının MİK değerlerinin 36.7 mg/mL ekstrakt; MBK değerlerinin ise sırasıyla 49.8 mg/mL ekstrakt olduğu belirlendi. ACD ekstraktının en etkili olduğu bakterinin 24.9 mg/mL ekstrakt MİK ve 39.6 mg/mL ekstrakt MBK değeri ile *S. uberis* ATCC 700407 suşunun olduğu belirlendi.

Ananas kabuğu ekstraktlarına karşı en yüksek dayanıklılığı gösteren bakteri suşunun ACE ekstraktı için 111.2 mg/mL ekstrakt MİK ve 157.3 mg/mL ekstrakt MBK değerleri ile *E. faecalis* ATCC 29212 suşu olduğu belirlendi. ACD ekstraktı için ise,

en yüksek değerlerin 151.8 mg/mL ekstrakt MİK değeri ve 197.3 mg/mL ekstrakt MBK değeri ile *S. aureus* ATCC 25923 suşuna ait olduğu belirlendi.

Çizelge 4.11: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerine karşı belirlenen minimal inhibisyon (MİK) ve minimal bakterisidal (MBK) konsantrasyonları (mg/mL). Belirlenen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına ve standart sapmalarına ($\pm$) aittir.

Suşlar	Ekstraktlar			
	ACE		ACD	
	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>E. coli</i> ATCC 25922	49.0 $\pm$ 0.97	72.0 $\pm$ 0.92	78.3 $\pm$ 0.51	130.4 $\pm$ 1.78
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13408	50.7 $\pm$ 0.85	63.3 $\pm$ 0.11	79.6 $\pm$ 0.89	112.4 $\pm$ 1.02
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	111.2 $\pm$ 1.17	157.3 $\pm$ 2.01	81.8 $\pm$ 0.67	113.9 $\pm$ 1.10
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	80.6 $\pm$ 0.72	117.3 $\pm$ 1.87	151.8 $\pm$ 1.87	197.3 $\pm$ 2.46
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	36.7 $\pm$ 0.19	49.8 $\pm$ 0.18	85.7 $\pm$ 0.54	121.1 $\pm$ 1.09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	49.4 $\pm$ 0.65	66.0 $\pm$ 0.54	64.9 $\pm$ 0.27	86.9 $\pm$ 1.17
<i>S. uberis</i> ATCC 700407	75.7 $\pm$ 1.04	109.3 $\pm$ 1.78	24.9 $\pm$ 0.08	39.6 $\pm$ 0.04
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	76.9 $\pm$ 1.12	133.7 $\pm$ 3.01	44.2 $\pm$ 0.22	64.5 $\pm$ 0.81
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	91.6 $\pm$ 1.34	154.5 $\pm$ 2.77	67.0 $\pm$ 0.68	95.8 $\pm$ 1.39

4.6.3. Ekstraktların bakteri büyümlerine zamana bağlı etkileri

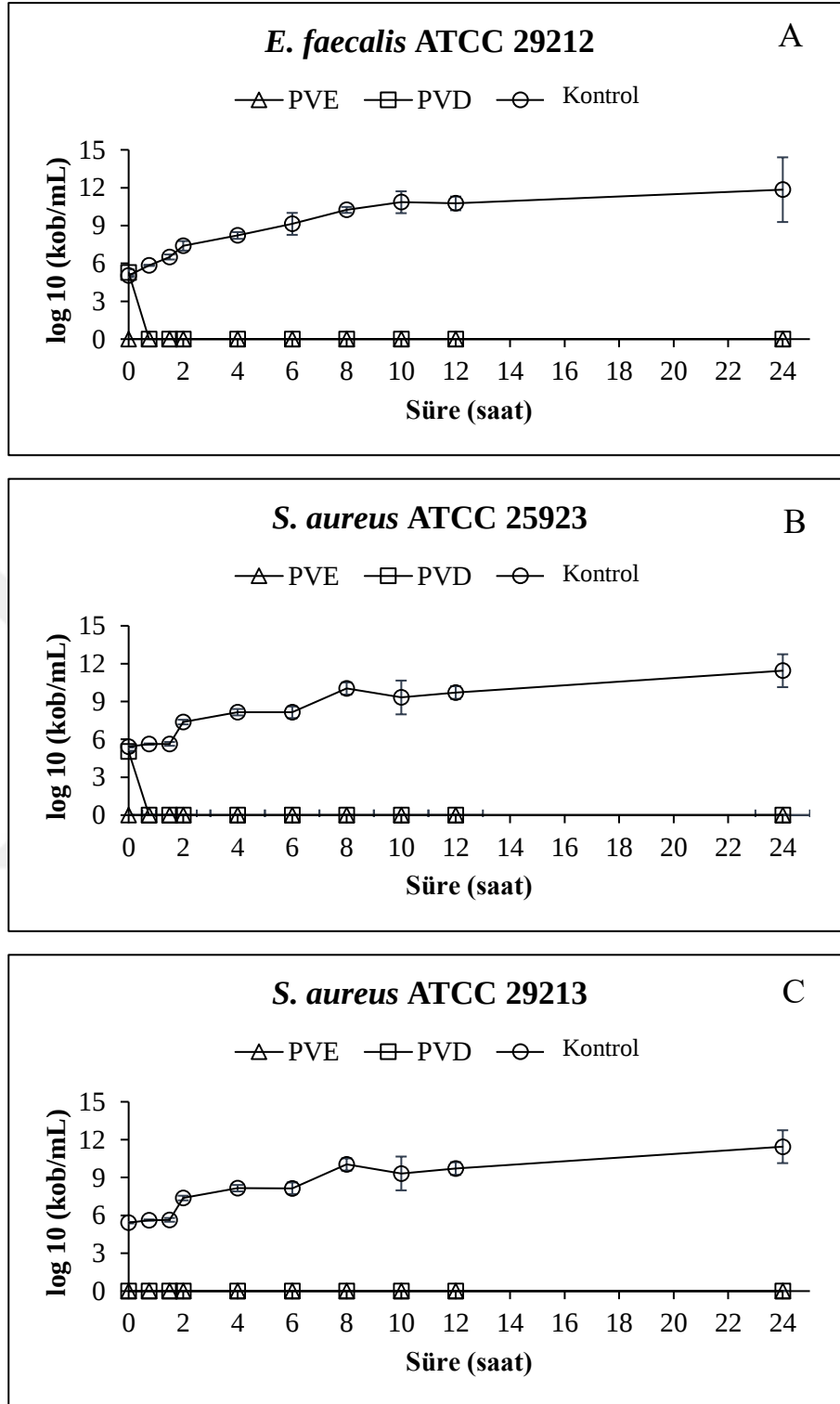
Kuyu difüzyonu, MİK ve MBK değerleri belirleme çalışmaları sonucunda ekstraktların 1/8 (s/s) konsantrasyonunda bakteri büyümlerine zamana bağlı olarak etkilerinin incelenmesine karar verildi.

4.6.3.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının bakteri büyümlerine zamana bağlı etkileri

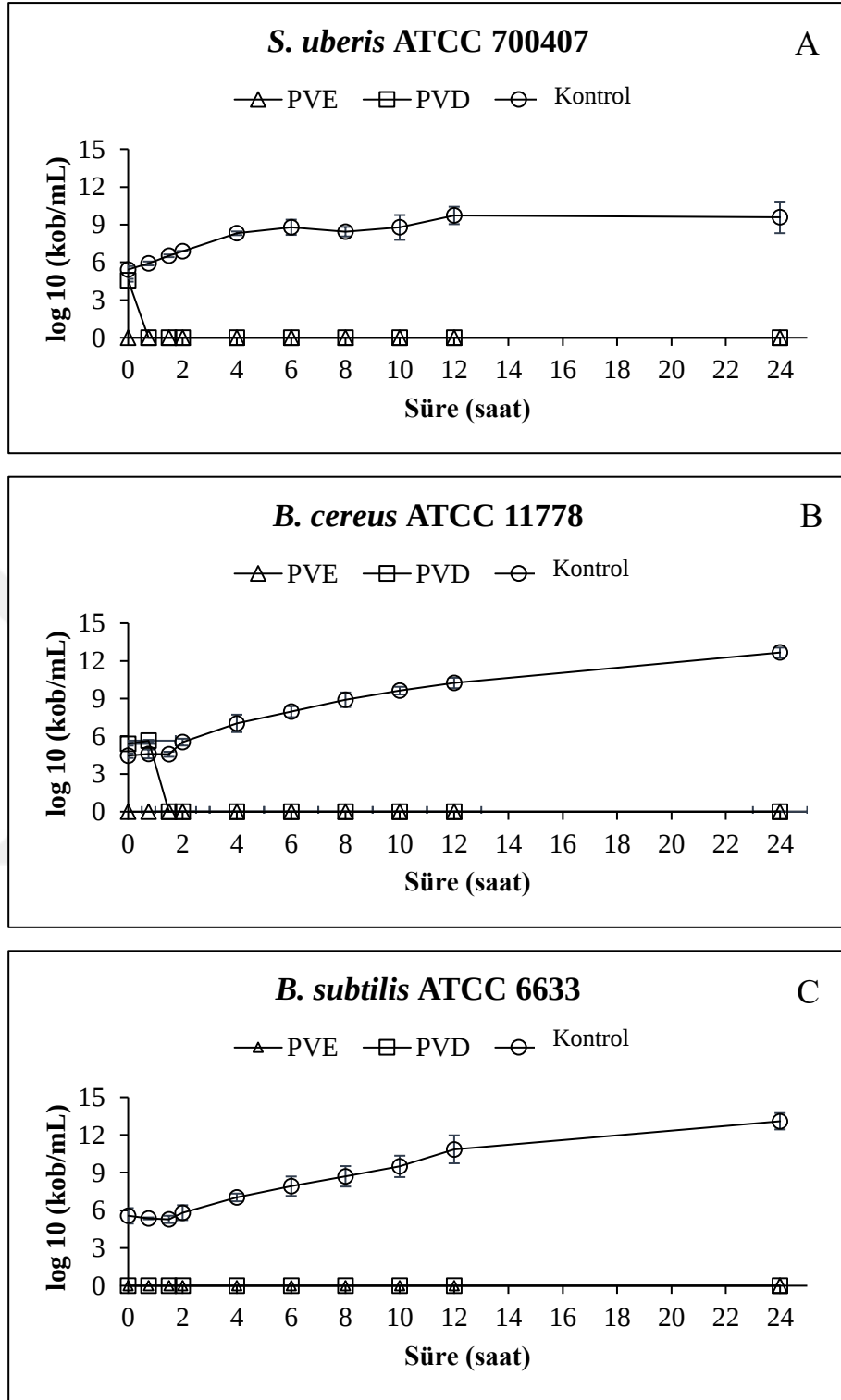
Çalışmada, Gram pozitif bakteri suşları *E. faecalis* ATCC 29121, *S. aureus* 25923, *S. uberis* ATCC 700407, *S. aureus* 29213, *B. subtilis* ATCC 11778 ve *B. cereus* ATCC 6633 ile ekstraktlar steril saf su ile sekiz kat seyreltilerek (1/8, s/s) kullanıldı. Şekil

4.17’de görüldüğü üzere, PVE ekstraktının bakterisidal etkisi (2 dakika), *B. cereus* ATCC 11778 suşu hariç diğer tüm suşlarda PVD ekstraktının bakterisidal etkisinden daha kısa sürede (90 dk) gerçekleştiği belirlendi. PVE ve PVD ekstraktlarının bakteri yoğunluğunu kısa süre içerisinde (en fazla 90 dk) 6 log kadar azalttığı görüldü (Şekil 4.16).





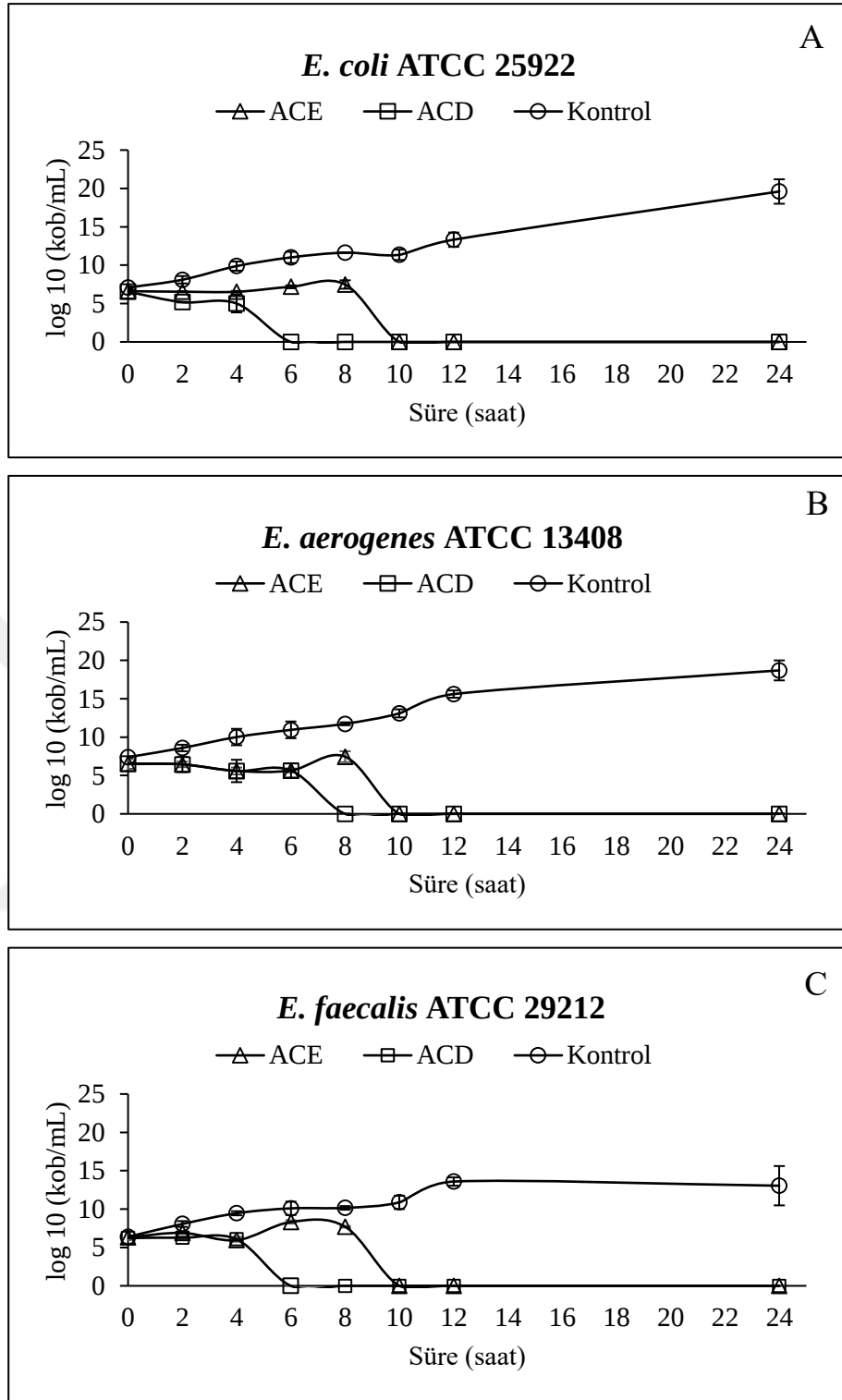
Şekil 4.16: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (A: *E. faecalis* ATCC 29212, B: *S. aureus* ATCC 25923 ve C: *S. aureus* ATCC 29213). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



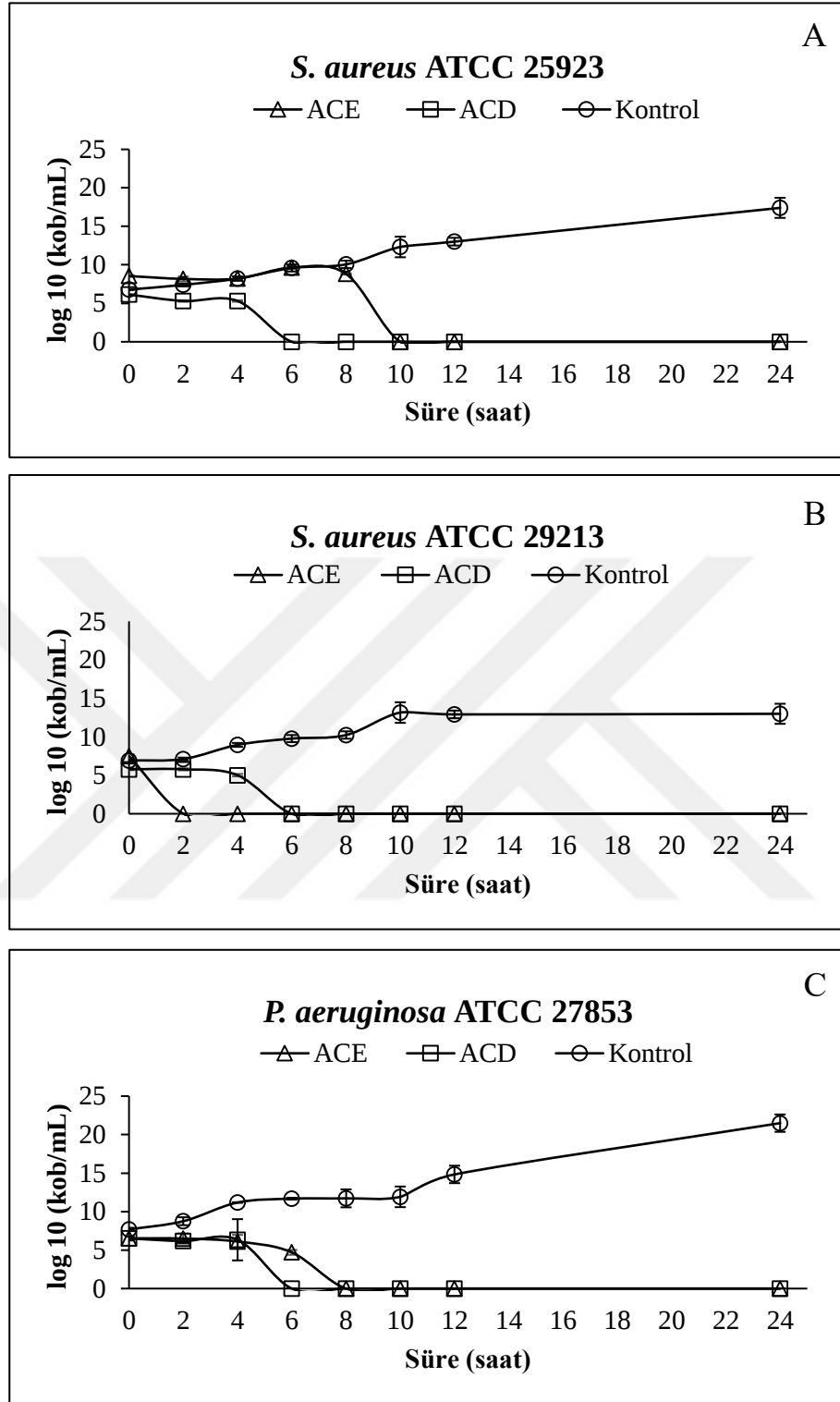
Şekil 4.17: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümlerine etkileri (A: *S. uberis* ATCC 700407, B: *B. cereus* ATCC 11778 ve C: *B. subtilis* ATCC 6633). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.6.3.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının bakteri büyümelerine zamana bağlı etkileri

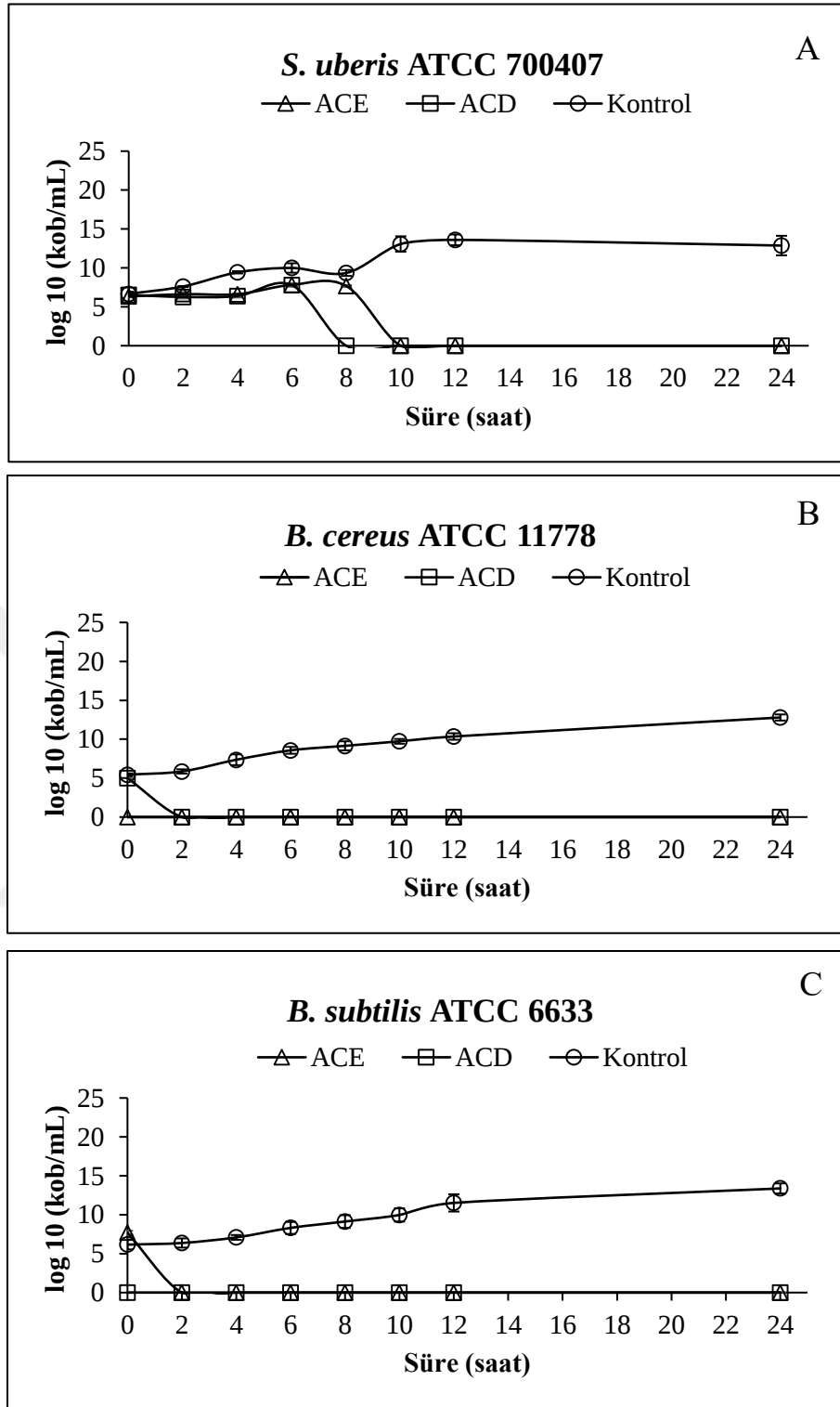
Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13408, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşları üzerinde karşı zamana bağlı büyüme özelliklerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada, ekstraktların Gram pozitif ve Gram negatif suşlarda öldürücü etki gösterdiği belirlendi. ACD ekstraktının *S. aureus* ATCC 29213 (ACE ekstraktı için 2 saat) ve *B. cereus* ATCC 11778 (ACE ekstraktı için 2 dakika) suşları hariç tüm diğer suşlarda ACE ekstraktından daha kısa sürede bakterisidal etki gösterdiği saptandı. ACE ve ACD ekstraktlarına karşı en hassas olan suşların *S. aureus* ATCC 29213 (sırasıyla 2 ve 6 saat), *B. cereus* ATCC 11778 (2 dakika ve 2 saat) ve *B. subtilis* ATCC 6633 (2 saat ve 2 dakika) suşlarının olduğu belirlendi. ACD ekstraktının genel olarak 6-8 saat içerisinde, ACE ekstraktının ise 8-10 saat içerisinde test bakterilerine karşı bakterisidal etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19).



Şekil 4.17: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (A: *E. coli* ATCC 25922, B: *E. aerogenes* ATCC 13408 ve C: *E. faecalis* ATCC 29212). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



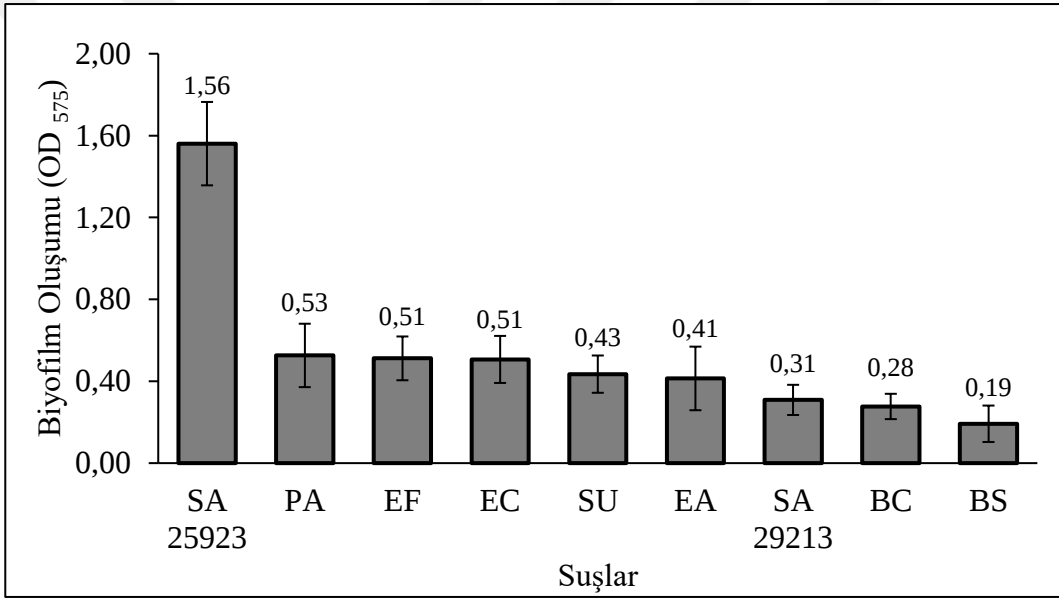
Şekil 4.18: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.19: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının test bakterilerinin zamana bağlı büyümelerine etkileri (*S. uberis* ATCC 700407, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633). Değerler en az  bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata ubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.7. Ekstraktların antibiyofilm etkinlikleri

Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole boyama yöntemi (OD_{575}) ile değerlendirildi ve Şekil 4.20’de gösterildi. Referans zayıf biyofilm yapan suş olarak çalışmalarda kullanılan *S. aureus* ATCC 29213 suşu ($0.31 OD_{575}$) ve ondan daha düşük miktarda biyofilm oluşturan suşlar (*B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633) biyofilm çalışmalarında kullanılmadı. Bu nedenle test bakterilerinden biyofilm yoğunlukları 0.41 ve $1.56 OD_{575}$ aralığında değişen suşlar seçildi. Biyofilm pozitif referans suş olan *S. aureus* ATCC 25923 suşunun belirgin şekilde en yüksek ($1.56 OD_{575}$) biyofilm oluşumunu gerçekleştirdiği saptandı. *E. aerogenes* ATCC 13048 suşu ise en düşük ($0.41 OD_{575}$) biyofilm üretimini gerçekleştirdi.



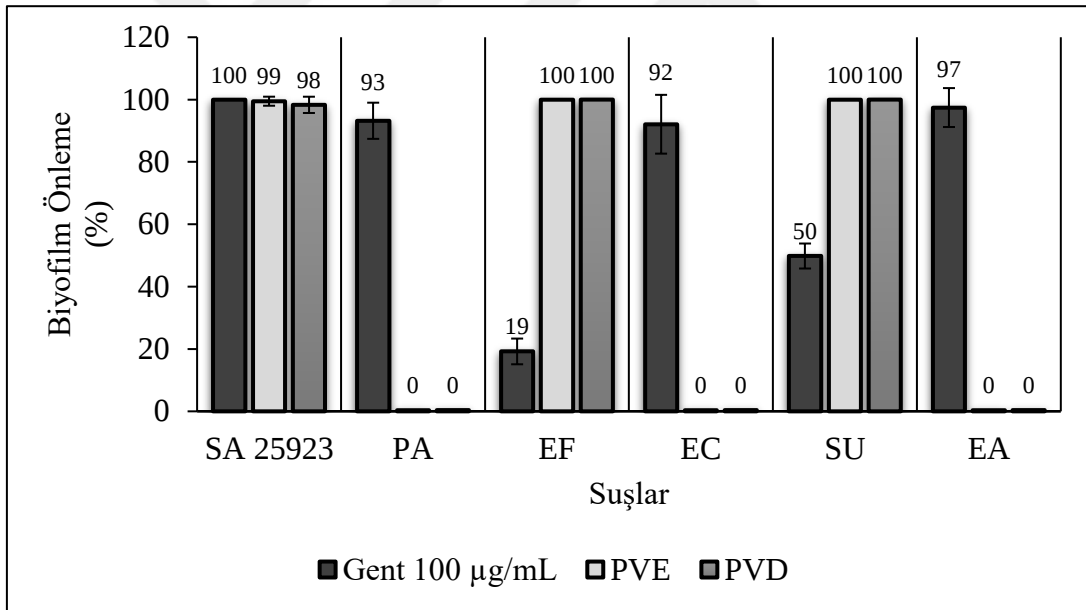
Şekil 4.20: Test bakterilerinin polistiren mikrotitrasyon plakalarında oluşturduğu biyofilm tabakalarının yoğunluğu (OD_{575}) (SA: *S. aureus* ATCC 25923, PA: *P. aeruginosa* ATCC 27853, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, EC: *E. coli* ATCC 25922, SU: *S. uberis* ATCC 700407 ve EA: *E. aerogenes* ATCC 13048). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.7.1. Ekstraktların biyofilm oluşumunu önleyici etkileri

Antioksidan kapasite ve antimikrobiyal etki belirleme çalışmalarında elde edilen veriler sonucunda, ekstraktların $1/8$ (s/s) oranında seyreltilerek kullanılmasına karar verildi. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda ekstraktların etkinlikleri bu konsantrasyonda kullanılarak incelendi.

4.7.1.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleyici etkileri

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleyici etkinliğinin çalışmadaki Gram-pozitif bakteriler üzerinde oldukça yüksek olduğu (%98-100) saptandı. Ayrıca *E. faecalis* ATCC 29212 ($p<0.05$) ve *S. uberis* ATCC 700407 ($p<0.05$) suşlarının biyofilm oluşumunu önlemede, PVE ve PVD ekstraktlarının kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) uygulamasından daha yüksek etkiye sahip olduğu görüldü. Çalışmada değerlendirilen Gram negatif bakterilerin (*E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853) biyofilm oluşumlarına etkileri olmadığı belirlenen PVE ve PVD ekstraktlarından farklı bir şekilde gentamisin uygulamasının (100 µg/mL) %97-100 oranında bu bakterilerde biyofilm oluşumlarını önleyebildiği saptandı (Şekil 4.21).

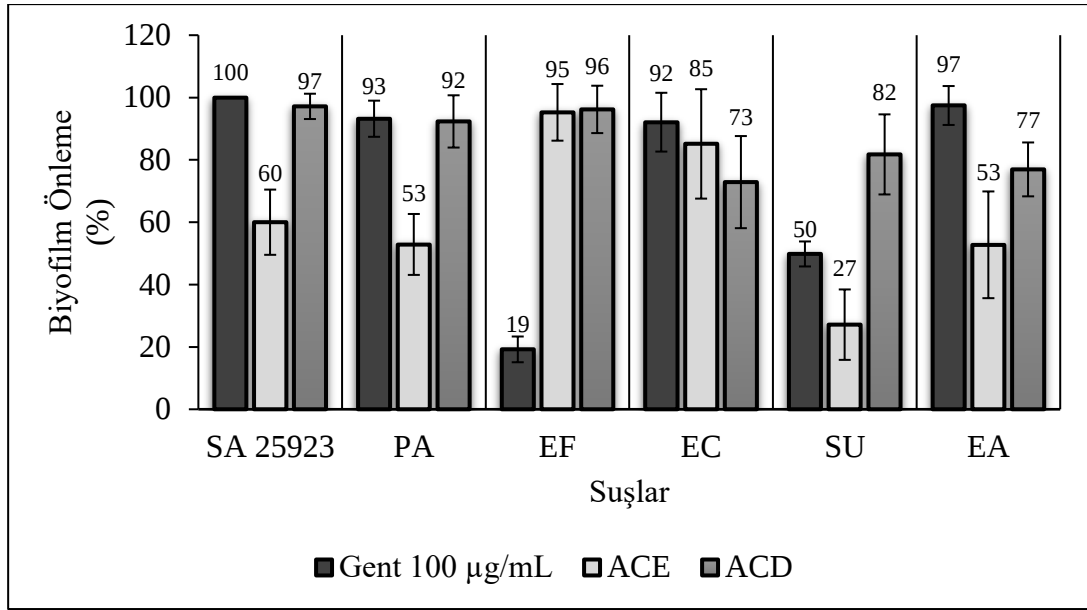


Şekil 4.21: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının test bakterilerinin biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (%) (SA: *S. aureus* ATCC 25923, PA: *P. aeruginosa* ATCC 27853, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, EC: *E. coli* ATCC 25922, SU: *S. uberis* ATCC 700407 ve EA: *E. aerogenes* ATCC 13048). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.7.1.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleyici etkileri

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının biyofilm oluşumunu önleyici etkinliğinin çalışmadaki Gram-pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde farklılık gösterdiği (%27-97) görüldü. *E. coli* ATCC 25922 suşu hariç tüm suşlarda ACD ekstraktının ACE ekstraktından biyofilm oluşumunu önlemede daha etkili olduğu belirlendi. Biyofilm oluşumunun önlenmesinde her iki ekstrakt uygulamasının da en yüksek etki gösterdiği suşun *E. faecalis* ATCC 29212 suşu olduğu ve bu suşun biyofilm oluşumunun ACE ekstraktı ile %95, ACD ekstraktı ile %97 oranında önlendiği belirlendi. Biyofilm oluşumlarının farklı ekstrakt uygulamaları ile en düşük önlenme oranlarının ise, ACE ekstraktı ile *S. uberis* ATCC 407700 suşuna karşı %27 ve ACD ekstraktı ile ise *E. coli* ATCC 29212 suşuna karşı %73 olduğu görüldü.

Ayrıca *E. faecalis* ATCC 29212 ($p<0.05$) ve *S. uberis* ATCC 700407 ($p<0.05$) suşlarının biyofilm oluşumunu önlemede, PVE ve PVD ekstraktlarının kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) uygulamasından daha yüksek etkiye sahip olduğu görüldü. Kontrol olarak kullanılan gentamisinin (100 µg/mL) %19-100 oranında bu bakterilerde biyofilm oluşumunu önleyebildiği saptandı (Şekil 4.22).

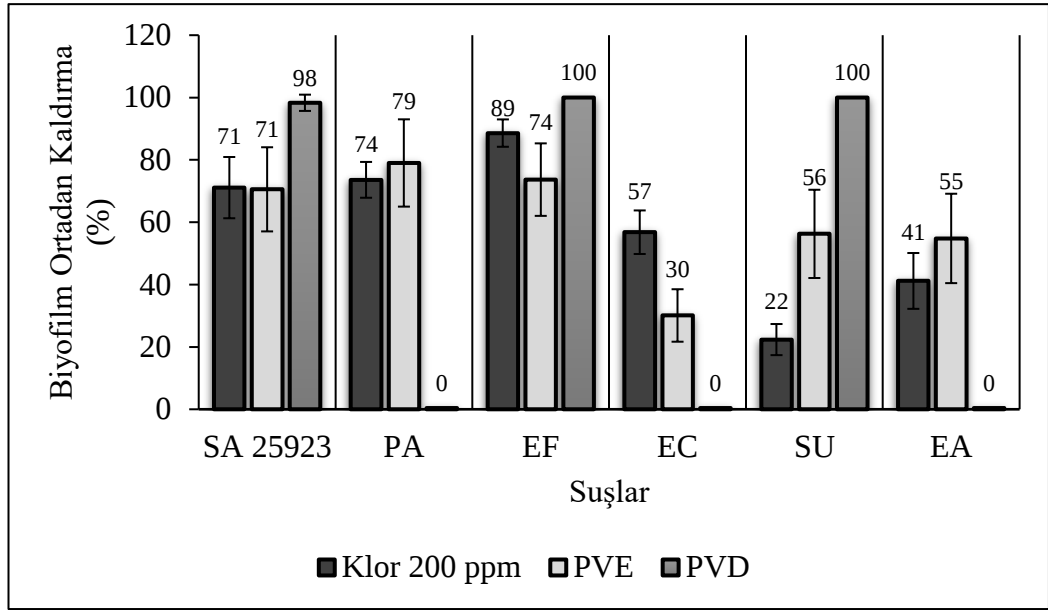


Şekil 4.22: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının test bakterilerinin biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (%) (SA: *S. aureus* ATCC 25923, PA: *P. aeruginosa* ATCC 27853, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, EC: *E. coli* ATCC 25922, SU: *S. uberis* ATCC 700407, EA: *E. aerogenes* ATCC 13048). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.7.2. Ekstraktların oluşan biyofilmleri ortadan kaldırma etkileri

4.7.2.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının oluşan biyofilmleri ortadan kaldırma etkileri

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının test bakterilerinin oluşturduğu olgun biyofilm tabakalarını (48 saatlik) ortadan kaldırma etkinlikleri Gram pozitif ve negatif test bakterileri üzerinde incelendi. Ekstraktların etkinliğini karşılaştırmak amacıyla biyofilmi ortadan kaldırmada 200 ppm klor çözeltisi kullanıldı. Klor uygulamasının biyofilmleri ortadan kaldırma etkinliğinin Gram pozitif ve negatif test bakterileri üzerinde sırasıyla %22-89 ve %41-74 oranları arasında değiştiği görüldü. PVE ekstraktının biyofilmleri ortadan kaldırma etkisinin Gram pozitif bakteriler için %56-74 oranları arasında, Gram negatif bakteriler için ise %30-79 oranları arasında değişiklik gösterdiği saptandı. Biyofilm ortadan kaldırmada PVD ekstraktının sadece Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu (%98-100) belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile klor uygulamalarının test bakterileri tarafından oluşan biyofilm tabakasının giderilmesine etkileri (%) (SA: *S. aureus* ATCC 25923, PA: *P. aeruginosa* ATCC 27853, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, EC: *E. coli* ATCC 25922, SU: *S. uberis* ATCC 700407, EA: *E. aerogenes* ATCC 13048). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.7.2.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının oluşan biyofilmleri ortadan kaldırma etkileri

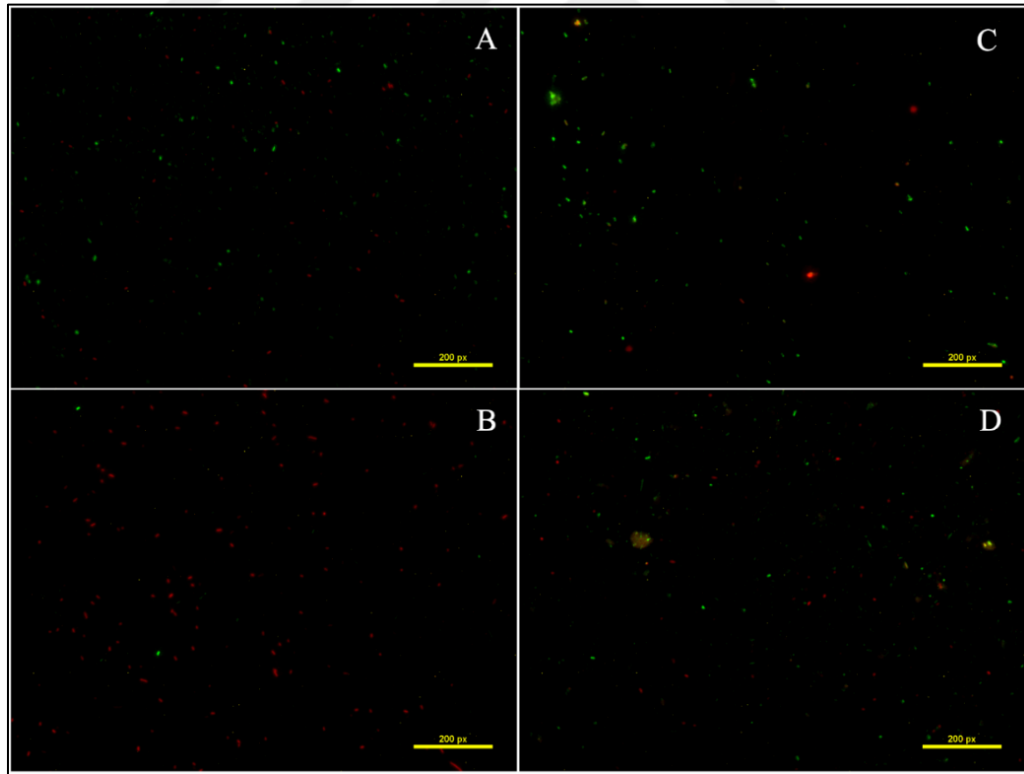
Ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının oluşan biyofilmleri ortadan kaldırmada etkisinin olmadığı görüldü.

4.8. Ekstraktların seçili bakteriler üzerinde biyofilm oluşumunu engelleyici etkilerinin floresan mikroskobu ile görüntülenmesi

Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşlarının 48 saatlik biyofilmlerinin oluşumunda, fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının engelleyici etkileri floresan mikroskobunda incelendi.

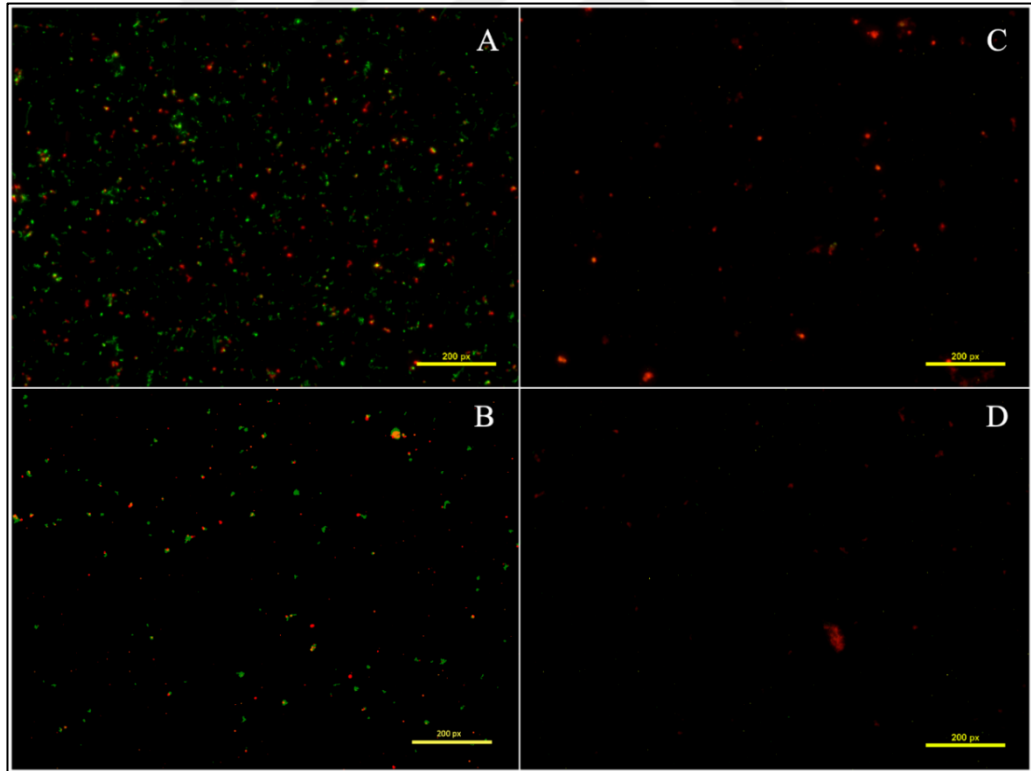
4.8.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının biyofilm oluşumunu engelleyici etkilerinin floresan mikroskobu ile görüntülenmesi

İncelemeler sonunda, PVE (C) ve PVD (D) ekstraktlarının *E. coli* ATCC 25922 suşunun biyofilmine karşı engelleyici etki göstermediği görüntüledi. Şekil 4.24'teki A fotoğrafı biyofilm kontrolü olan herhangi bir antibiyofilm ajan içermeyen uygulamadır. 48 saatlik inkübasyon sonunda, biyofilm oluşumunun, bakteri hücrelerinin öldüğü (kırmızı renge boyalı), fakat çoğunlukla canlı hücrelerin (yeşil renge boyalı) baskın olduğu bir yapı halinde geliştiği belirlendi. C ve D fotoğraflarında var olan yüksek miktarda canlı hücre varlığı bu durumu net bir şekilde gösterdi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) uygulamasının (B), *E. coli* ATCC 25922 suşunun biyofilmi içerisindeki hücrelerin neredeyse tamamını öldürdüğü görüntüledi. Bu çalışmada gerçekleştirilen antimikrobiyal ve antibiyofilm etki belirleme deneylerinden elde edilen sonuçlara paralel olarak PVE ve PVD ekstraktının Gram negatif bakterilerde etkisiz kaldığı bu çalışma ile de ortaya konuldu (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının *E. coli* ATCC 29212 suşunun biyofilm oluşumunu engelleyici etkileri (A: Biyofilm kontrol, B: Antibiyotik kontrol (100 µg/mL gentamisin), C: 1/8 (s/s) PVE uygulaması ve D: 1/8 (s/s) PVD uygulaması).

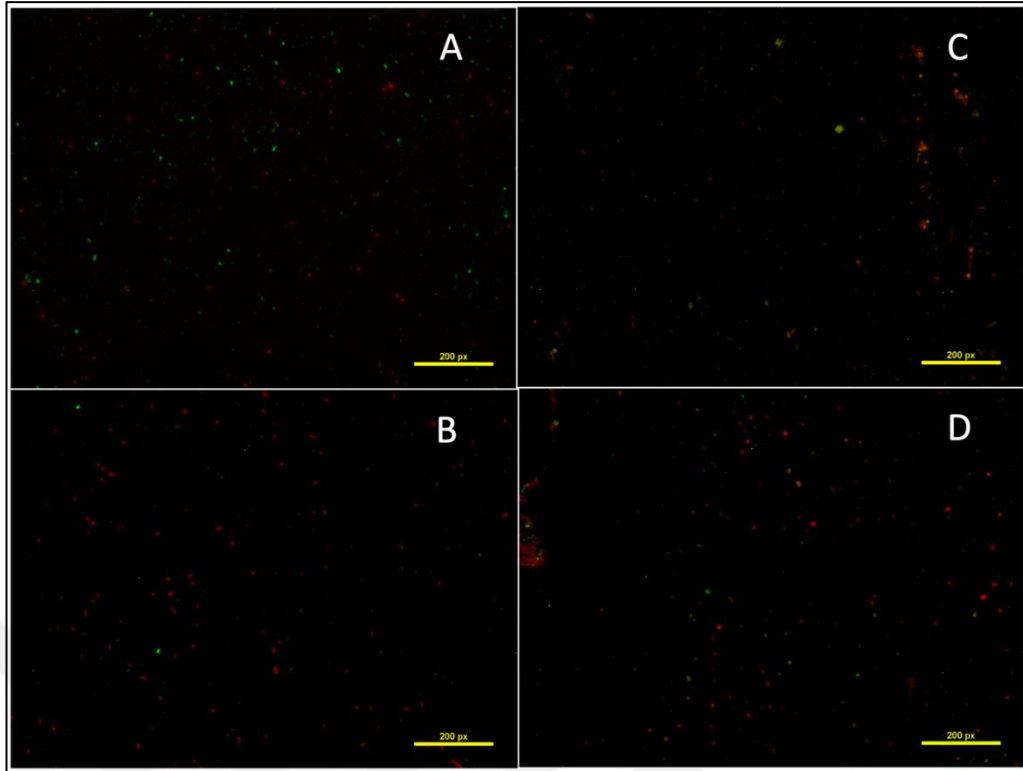
Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşunun biyofilmine karşı PVE (C) ve PVD (D) ekstraktlarının engelleyici edici etkilerinin yüksek olduğu görüntülendi. Şekil 4.25'teki A fotoğrafı biyofilm kontrolü olan antibiyofilm ajan içermeyen uygulama olarak belirtildi. 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşan biyofilmin bakterilerin öldüğü (kırmızı renge boyalı), fakat çoğunlukla canlı hücrelerin (yeşil renge boyalı) baskın olduğu bir yapı halinde geliştiği saptandı. C ve D fotoğraflarında sırası ile PVE ve PVD ekstraktlarının var olduğu uygulamalar olarak belirtildi. Bu fotoğraflarda belirgin bir şekilde ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923 biyofilminin oluşumunu inhibe etmede etkili olduğu saptandı. Kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) uygulaması (B) ile *S. aureus* 25923 suşunun biyofilmi içerisindeki hücrelerin sayısını azalttığı belirlendi. Bu çalışmada gerçekleştirilen antimikrobiyal ve antibiyofilm etki belirleme deneylerinden elde edilen sonuçlara paralel olarak, PVE ve PVD ekstraktının Gram pozitif bakterilerde yüksek etkiye sahip olduğu ortaya konuldu (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının *S. aureus* ATCC 25922 suşunun biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (A: Biyofilm kontrol, B: Antibiyotik kontrol (100 µg/mL gentamisin), C: 1/8 (s/s) PVE uygulaması, D: 1/8 (s/s) PVD uygulaması).

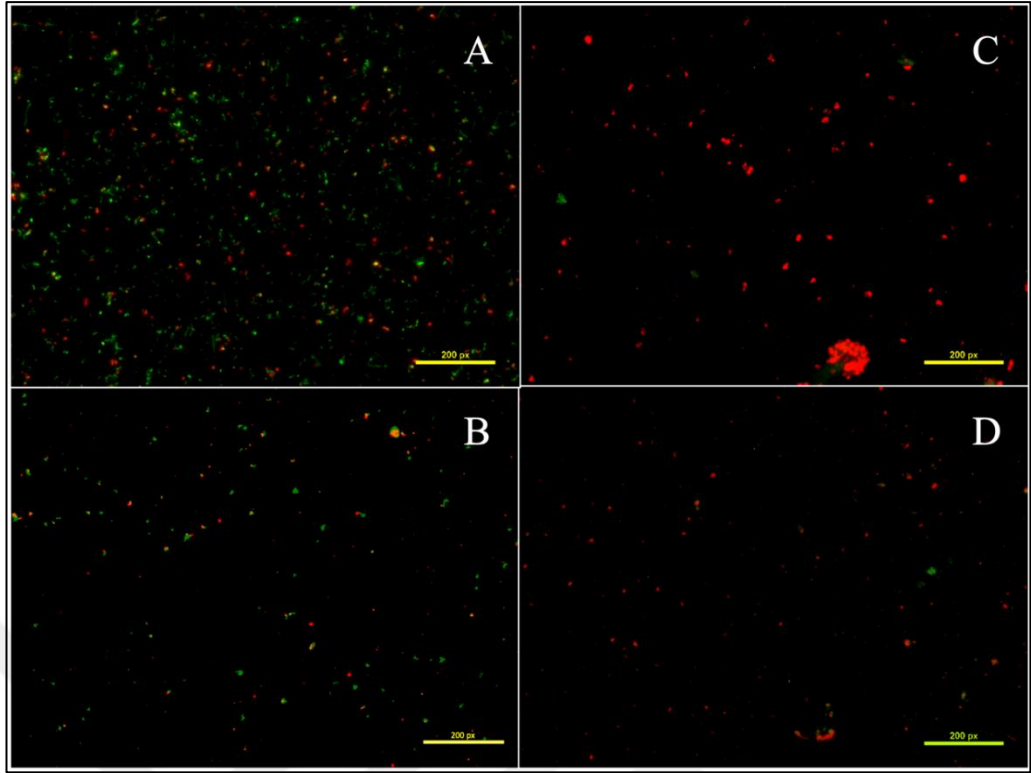
4.8.2. Ananas kabuğu ekstraktının biyofilm oluşumunu önleyici etkisinin floresan mikroskobu aracılığı ile görüntülenmesi

Floresan mikroskobu ile yapılan incelemeler sonunda, ACE (C) ve ACD (D) ekstraktlarının *E. coli* ATCC 25922 suşunun biyofilmine karşı inhibe edici etki gösterdiği görüntülendi. Şekil 4.26'daki A fotoğrafı biyofilm kontrolü olan antibiyofilm ajan içermeyen uygulama olarak belirtildi. 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşan biyofilimde bakterilerin öldüğü (kırmızı renge boyalı), fakat çoğunlukla canlı hücrelerin (yeşil renge boyalı) baskın olduğu bir yapı halinde geliştiği belirlendi. C ve D fotoğraflarında canlı hücre bulunmaması ACE ve ACD ekstraktlarının antibiyofilm etkinliğini işaret etti. Kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) uygulaması ile (B), *E. coli* ATCC 25922 suşunun biyofilmi içerisindeki hücrelerin neredeyse tamamının öldüğü görüntülendi. Bu çalışmada gerçekleştirilen antimikrobiyal ve antibiyofilm etki belirleme deneylerinden elde edilen sonuçlara paralel olarak ACE ve ACD ekstraktının Gram negatif bakterilerde antibiyofilm etkinliğe de sahip olduğu ortaya konuldu (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının *E. coli* ATCC 29212 suşunun biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (A: Biyofilm kontrol, B: Antibiyotik kontrol (100 µg/mL gentamicin), C: 1/8 (s/s) ACE uygulaması ve D: 1/8 (s/s) ACD uygulaması).

Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşunun biyofilmine karşı ACE (C) ve ACD (D) ekstraktlarının inhibe edici etkisinin yüksek olduğu görüntülendi. Şekil 4.27'deki A fotoğrafı biyofilm kontrolü olan antibiyofilm ajan içermeyen uygulama olarak belirtildi. 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşan biyofilmde, hücrelerin öldüğü (kırmızı renge boyalı), fakat çoğunlukla canlı hücrelerin (yeşil renge boyalı) baskın olduğu bir yapı halinde geliştiği görüldü. C ve D fotoğraflarında sırası ile ACE ve ACD ekstraktlarının var olduğu uygulamaları gösterildi. Bu fotoğraflarda belirgin bir şekilde ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923 biyofilm oluşumunu inhibe etmede etkili olduğu görüldü. Kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) uygulaması (B), *S. aureus* 25923 suşunun biyofilmi içerisindeki hücrelerin sayısını kontrole kıyasla azalttığı belirlendi. Bu çalışmada gerçekleştirilen antimikrobiyal ve antibiyofilm etki belirleme deneylerinden elde edilen sonuçlara paralel olarak ACE ve ACD ekstraktının Gram pozitif bakterilerde yüksek etkiye sahip olduğu ortaya konuldu (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gentamisin uygulamalarının *S. aureus* ATCC 25922 suşunun biyofilm oluşumunu önleyici etkileri (A: Biyofilm kontrol, B: Antibiyotik kontrol (100 µg/mL gentamisin), C: 1/8 (s/s) ACE uygulaması ve D: 1/8 (s/s) ACD uygulaması).

4.9. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkileri

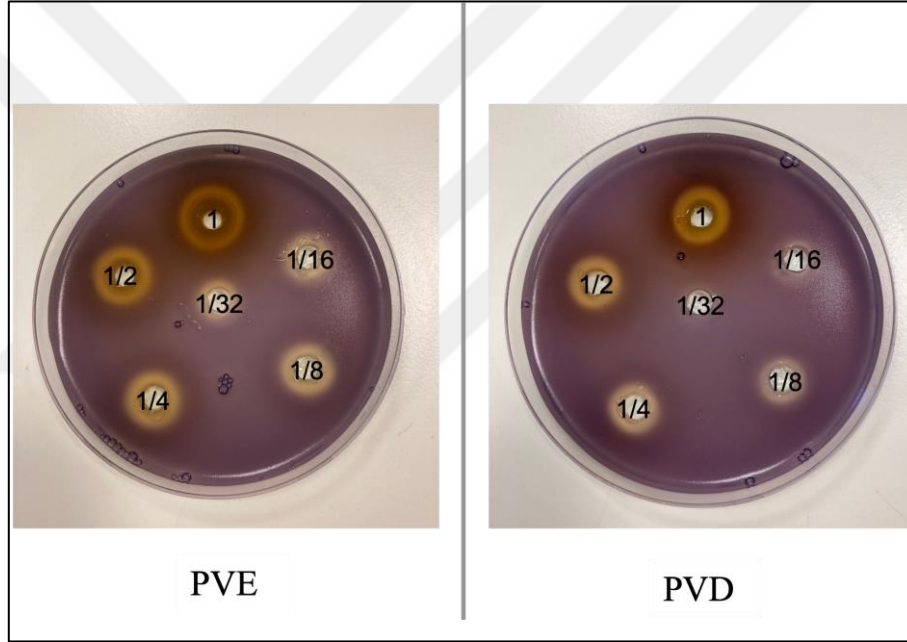
Bakterilerde iletişimi sağlayan yeter sayı algılama (*quorum sensing* (QS)) için model bir mikroorganizma olan *C. violaceum* bakterisinin viyolasein üretimine, fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının etkisi kalitatif ve kantitatif olarak incelendi.

4.9.1. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif olarak değerlendirilmesi

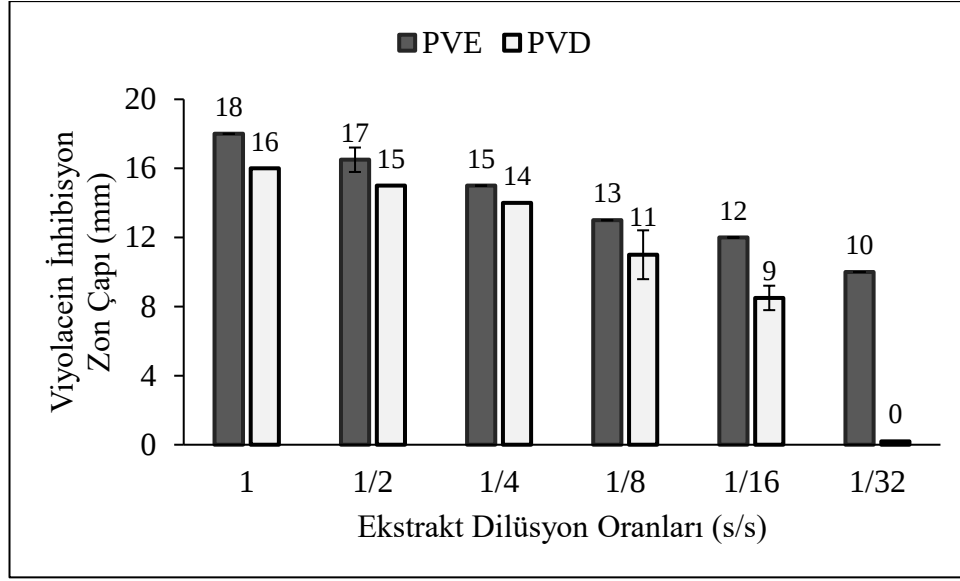
Ekstraktların anti-QS etkinliklerini kalitatif olarak değerlendirmek amacıyla *C. violaceum* ATCC 12472 suşu ve dökme plak yöntemi ve kuyu difüzyonu yöntemlerinden faydalanıldı.

4.9.1.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif olarak değerlendirilmesi

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları ile gerçekleştirilen bu çalışmada, PVE ekstraktının *C. violaceum* ATCC 12472 suşu üzerinde PVD ekstraktından daha yüksek anti-QS etkinliğe sahip olduğu görüldü. Ekstraktların seyreltilmeden kullanıldığı direkt uygulamada, PVE ve PVD ekstraktlarının *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zon çaplarının sırasıyla 18 ve 16 mm olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ekstraktların etkinliğinin uygulama konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak değiştiği belirlendi (Şekil 4.28, Şekil 4.29).



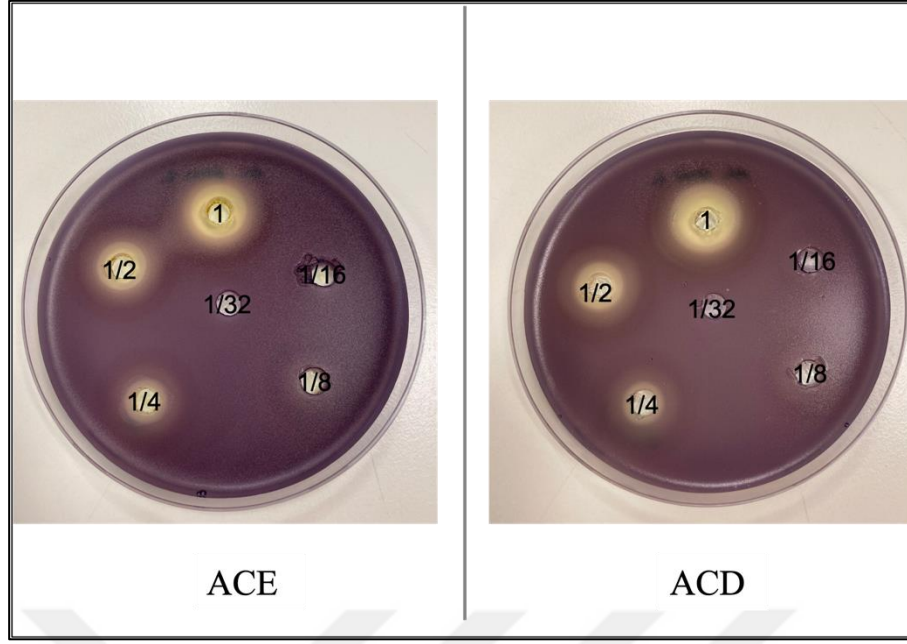
Şekil 4.28: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/32, s/s) *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zonları.



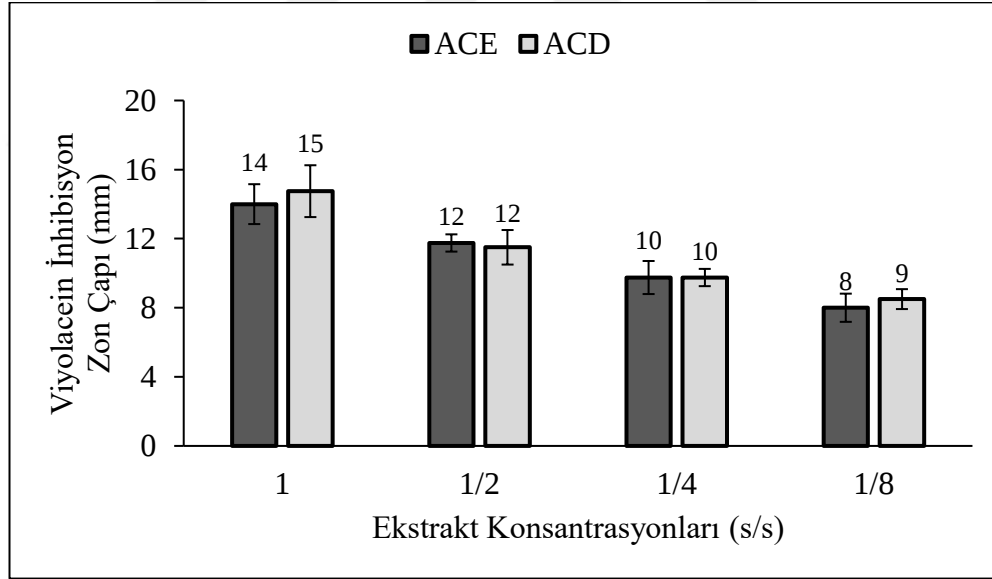
Şekil 4.29: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/32, s/s) *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zon çapları (mm). Belirlenen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.9.1.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kalitatif olarak değerlendirilmesi

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları ile gerçekleştirilen bu çalışmada, ACD ekstraktının *C. violaceum* ATCC 12472 suşu üzerinde ACE ekstraktından daha yüksek anti-QS etkinliğe sahip olduğu görüldü. Ekstraktların seyreltilmeden kullanıldığı direkt uygulamada, ACE ve ACD ekstraktlarının *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zon çaplarının sırasıyla 14 ve 15 mm olduğu belirlendi ($p>0.05$). Ekstraktların etkinliğinin uygulama konsantrasyonları ile doğru orantılı olduğu görüldü (Şekil 4.30, Şekil 4.31).



Şekil 4.30: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/32, s/s) *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zonları.



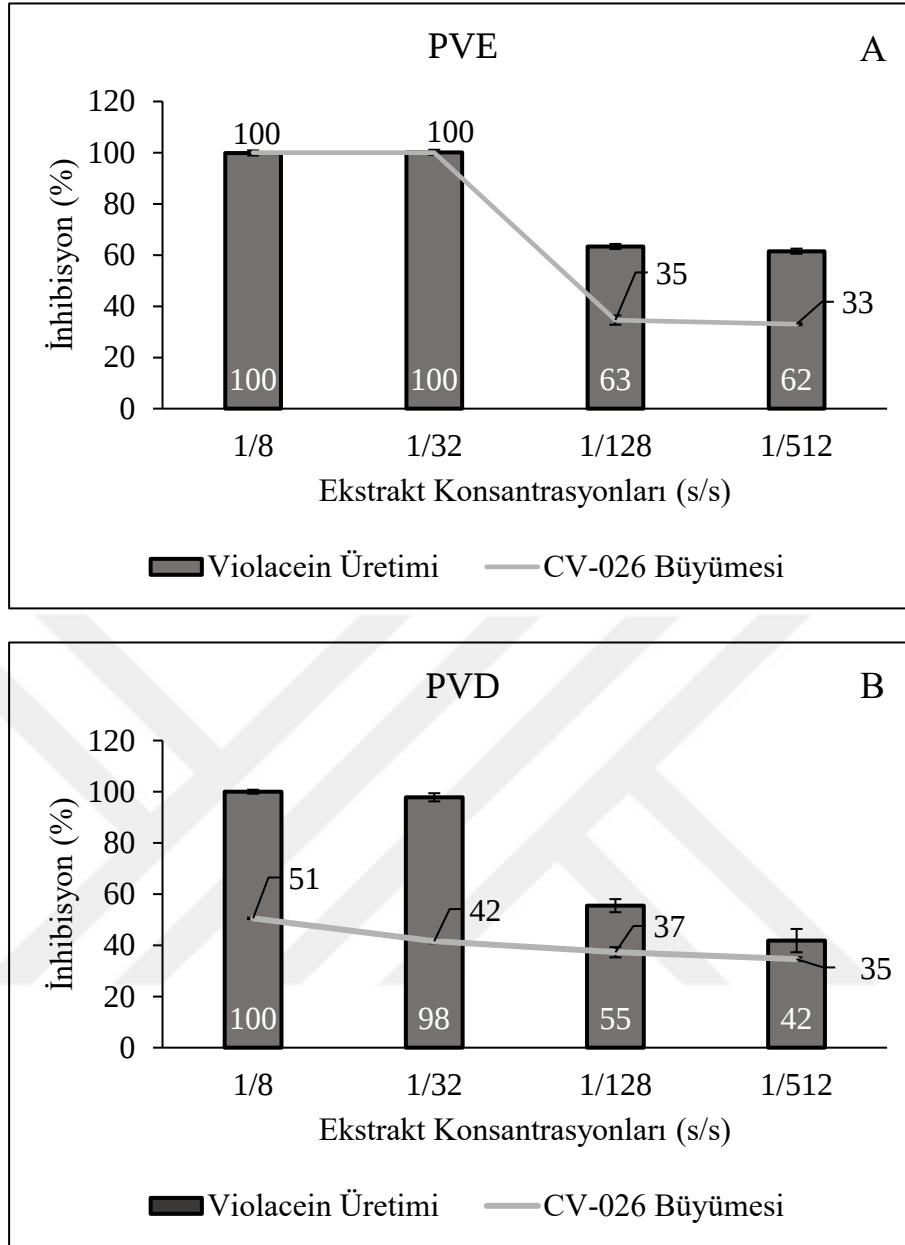
Şekil 4.31: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarında (1-1/8, s/s) *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasein üretimine etkileri ile oluşan inhibisyon zon çapları (mm). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.9.2. Ekstraktların yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi

Ekstraktların anti-QS etkinliklerini kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla violasein üretimini indükleyen HSL’u üretemeyen mutant *C. violaceum* CV026 suşu, ekstrakt varlığında ve dışardan HSL eklenen ortamda çalkalamalı inkübasyona maruz bırakıldı. İnkübasyon sonunda viyolasein miktarındaki azalış (%) ile kültür kabı içerisindeki canlı hücre sayısındaki azalış (%) belirlenerek ekstraktların anti-QS etkisi değerlendirildi.

4.9.2.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının viyolasein üretimine ve *C. violaceum* CV026 suşunun canlılığı üzerinde kantitatif etkileri incelendi. Bu çalışma sonucunda, tüm ekstrakt konsantrasyonları değerlendirildiğinde (1/8, 1/32, 1/128 ve 1/512 (s/s)) PVE ekstraktının viyolasein inhibisyonuna etkisinin (%63-100) PVD ekstraktının etkisinden (%42-100) daha yüksek olduğu görüldü. Viyolasein miktarındaki bu azalmanın esas sebebini belirleyebilmek amacıyla ilgili kültür süspansiyonlarından alınan örnekler ile yapılan canlı sayımı sonuçlarına göre PVE ekstraktının 1/8 ve 1/32 (s/s) dilüsyonlarının *C. violaceum* CV026 suşuna karşı bakterisidal etkinliğinin olduğu saptandı. Ancak 1/128 ve 1/512 (s/s) gibi ileri dilüsyonlarda viyolasein inhibisyonu sırasıyla %63 ve %62 iken, PVE ekstraktının ilgili dilüsyonlarında bakteriyostatik etkinin olduğu (sırasıyla %35 ve 33) belirlendi (Şekil 4.33). PVD ekstraktının 1/8 ve 1/32 (s/s) dilüsyonlarında %100 ve %98 oranında viyolasein inhibisyonu gözlenirken, ilgili konsantrasyonlarda bakteriyostatik etkinin olduğu saptandı (%51 ve %42). PVD ekstraktının 1/128 ve 1/512 (s/s) dilüsyonlarında ise sırasıyla %55 ve %42 oranlarında viyolasein inhibisyonu ve %37 ve %35 oranlarında bakteriyostatik etkiye sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.32).

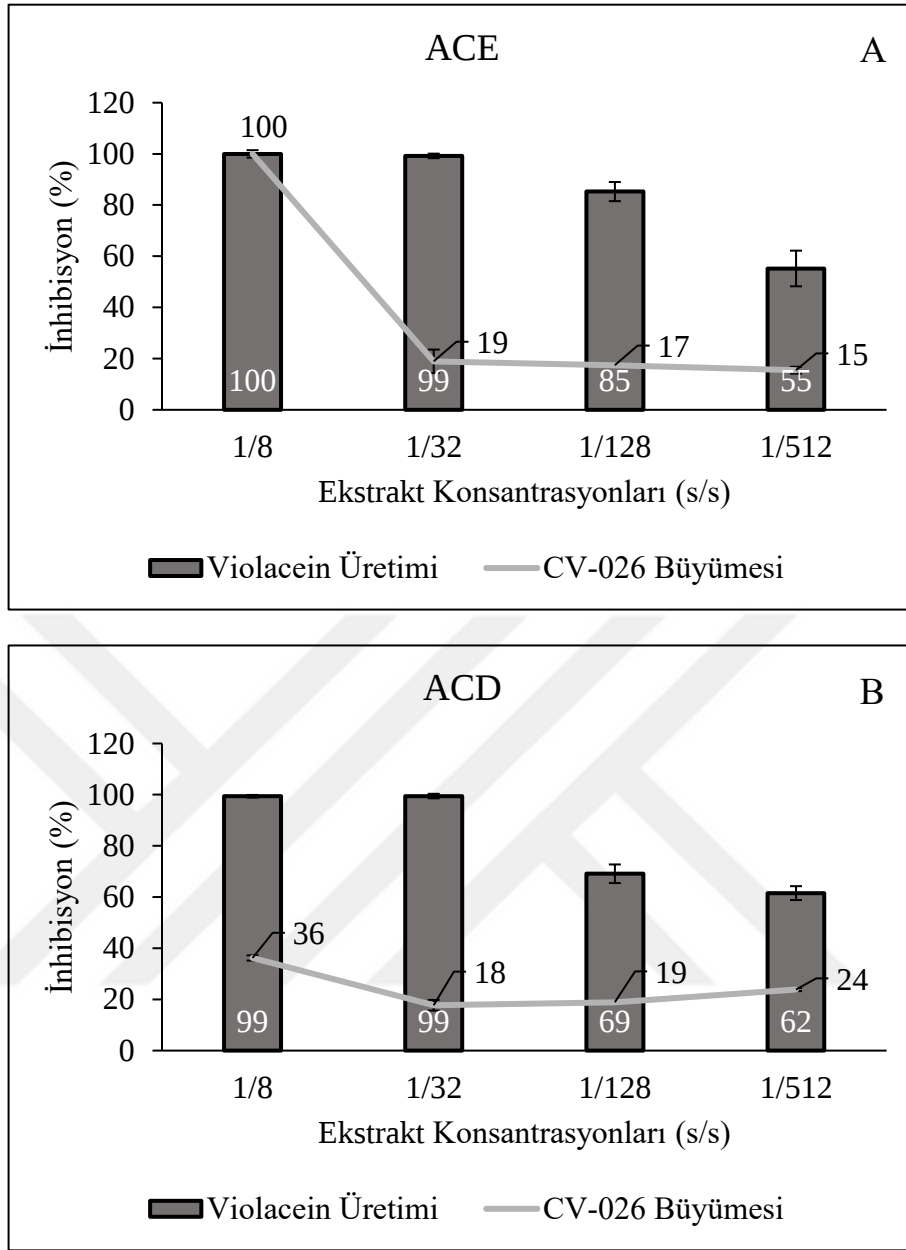


Şekil 4.32: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE (A)) ve su (PVD (B)) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1/8-1/512, s/s) *C. violaceum* CV026 suşunun HSL indüksiyonlu viyolasein üretimine ve suşun canlılığına (% kob inhibisyonu) birlikte etkisi. Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.9.2.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının yeter sayı algılama üzerine etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının ekstraktlarının viyolasein üretimine ve *C. violaceum* CV026 suşunun canlılığı üzerinde kantitatif etkileri incelendi. Bu çalışma sonucunda, tüm ekstrakt konsantrasyonları değerlendirildiğinde (1/8, 1/32, 1/128 ve 1/512 (s/s)) ACE ekstraktının viyolasein inhibisyonuna etkisinin

(%55-100) ACD ekstraktının etkisinden (%99-62) daha yüksek olduğu görüldü. Viyolasein miktarındaki bu azalmanın esas sebebini belirleyebilmek amacıyla ilgili kültür süspansiyonlarından alınan örnekler ile yapılan canlı sayımı sonuçlarına göre ACE ekstraktının 1/8 ve 1/32 (s/s) dilüsyonlarının *C. violaceum* CV026 suşuna karşı bakterisidal etkinliğinin olduğu saptandı. Fakat 1/128 ve 1/512 (s/s) gibi ileri dilüsyonlarda viyolasein inhibisyonu sırasıyla %85 ve %55 iken, ACE ekstraktının ilgili dilüsyonlarında bakteriyostatik etkinin olduğu (sırasıyla %17 ve %15) belirlendi (Şekil 4.34). ACD ekstraktının 1/8 ve 1/32 (s/s) dilüsyonlarında %99 oranında viyolasein inhibisyonu gözlenirken, ilgili konsantrasyonlarda bakteriyostatik etkinin olduğu saptandı (%36 ve %18). ACD ekstraktının 1/128 ve 1/512 (s/s) dilüsyonlarında ise sırasıyla %69 ve %62 oranlarında viyolasein inhibisyonu ve etki %19 ve %24 oranlarında bakteriyostatik etkiye sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.33).



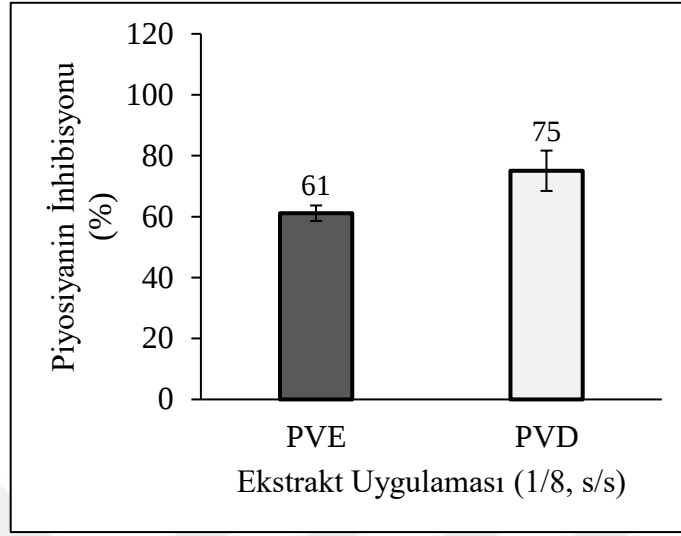
Şekil 4.33: Ananas kabuğu etanol (ACE (A)) ve su (ACD (B)) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1/8-1/512, s/s) *C. violaceum* CV026 suşunun HSL indüksiyonlu violasein üretimine ve suşun canlılığına (% kob inhibisyonu) birlikte etkisi. Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.10. Ekstraktların piyosiyenin üretimine etkileri

4.10.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının piyosiyenin üretimine etkileri

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının 1/8 konsantrasyonunda uygulamalarının, *P. aeruginosa* PAO1 suşunun piyosiyenin

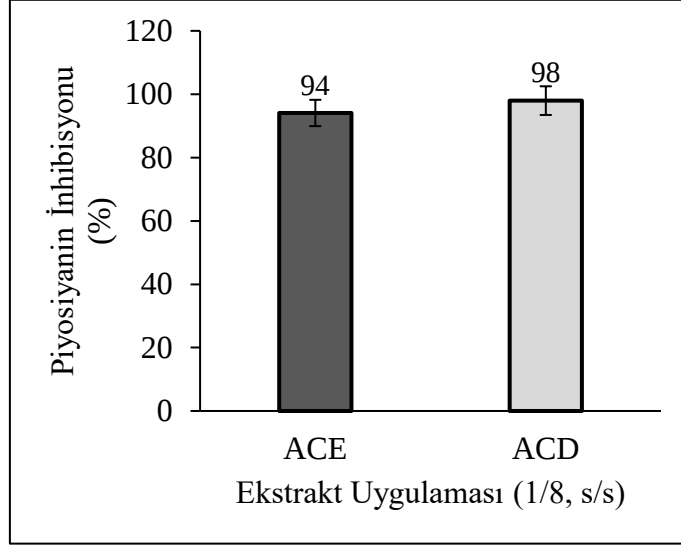
üretimine etkileri incelendi. PVE ve PVD ekstraktlarının piyosiyanın üretimini sırasıyla %61 ve %75 oranlarında inhibe ettiği saptandı (Şekil 4.34).



Şekil 4.34: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının (1/8, s/s) *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı piyosiyanın üretimini inhibe edici etkileri (%). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.10.2. Ananas ekstraktlarının piyosiyanın üretimine etkileri

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının 1/8 konsantrasyonunda uygulamalarının, *P. aeruginosa* PAO1 suşunun piyosiyanın üretimine etkileri incelendi. ACE ve ACD ekstraktlarının piyosiyanın üretimini sırasıyla %94 ve %98 oranlarında inhibe ettiği saptandı (Şekil 4.35).

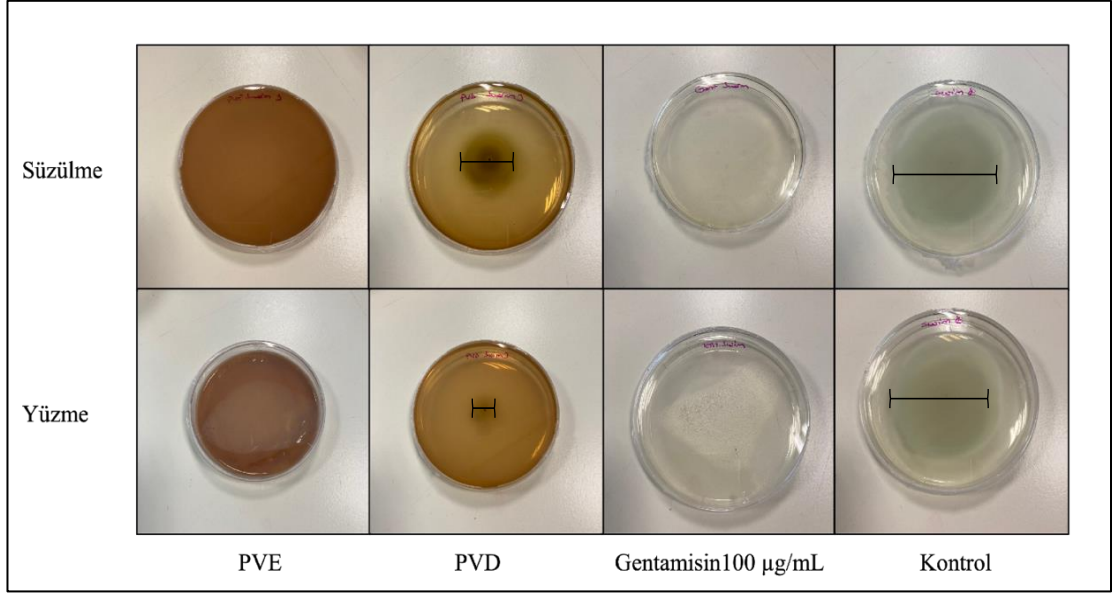


Şekil 4.35: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının (1/8, s/s) *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı piyosiyenin üretimini inhibe edici etkileri (%). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

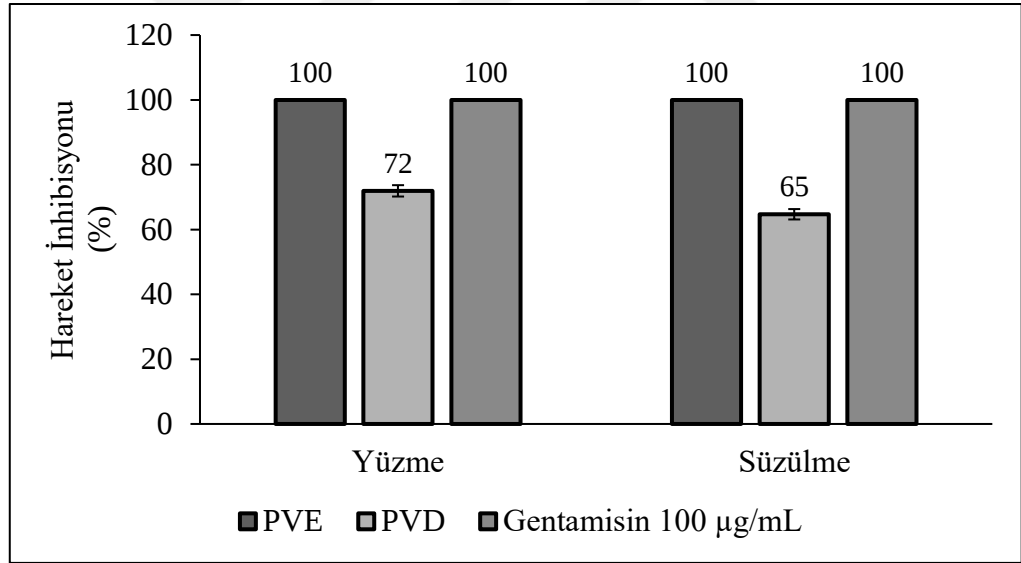
4.11. Ekstraktların hücre hareketine etkileri

4.11.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının hücre hareketine etkileri

Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktlarının bakteriyel hareket üzerine etkisi *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı değerlendirildi (Şekil 4.36). *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme ve süzülme kabiliyetinin, 1/8 (s/s) oranında PVE ekstraktının veya (100 µg/mL) bulunduğu ortamda %100 oranında inhibe olduğu görüldü (Şekil 4.37). PVD ekstraktının bulunduğu ortamda ise, *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme ve süzülme kabiliyetinin sırasıyla %72 ve %65 oranında inhibe olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil 4.37).



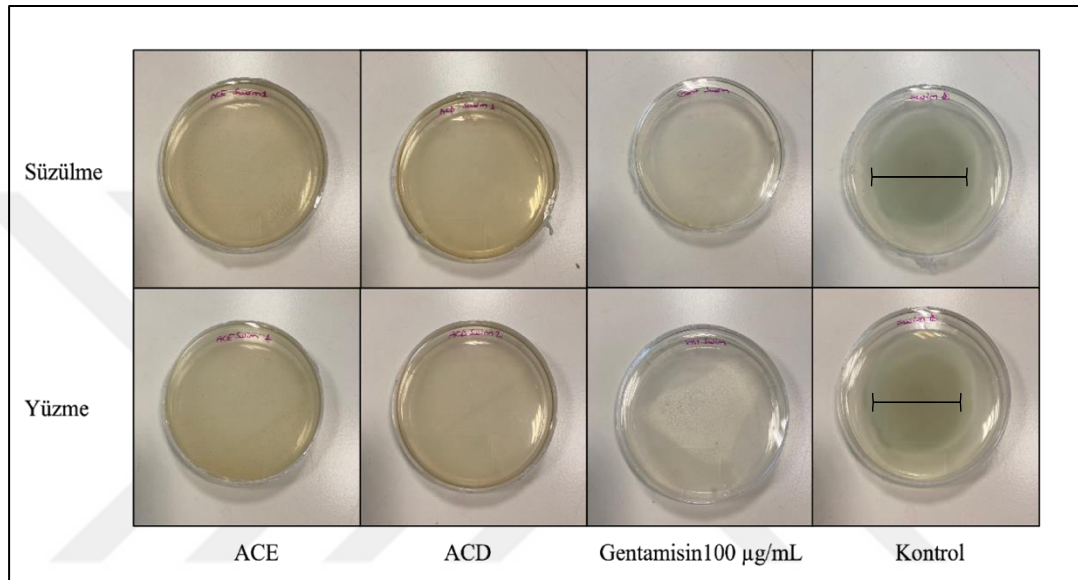
Şekil 4.36: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE), su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının *P. aeruginosa* PAO1 suşunun süzülme ve yüzme hareketine etkileri (Kontrol: Ekstrakt veya antibiyotik içermeyen ortamda inkübe olmuş kültür).



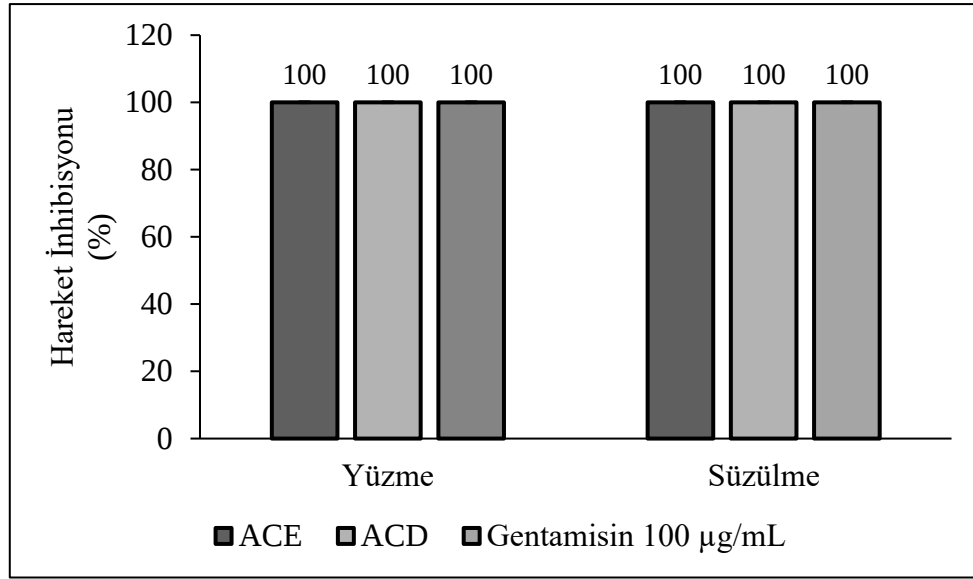
Şekil 4.37: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE), su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamaları ile *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme ve süzülme hareketlerinin inhibisyonu (%). Belirlenen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.11.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının hücre hareketine etkileri

Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktlarının bakteriyel hareket üzerine etkisi *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı değerlendirildi (Şekil 4.38). *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme ve süzülme kabiliyetinin, 1/8 (s/s) oranında ACE, ACD ekstraktının veya kontrol olarak kullanılan gentamisin (100 µg/mL) bulunduğu ortamda ise %100 oranında inhibe olduğu görüldü. ($p<0.05$) (Şekil 4.39).



Şekil 4.38: Ananas kabuğu etanol (ACE), su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının *P. aeruginosa* PAO1 suşunun süzülme ve yüzme hareketine etkileri (Kontrol: Ekstrakt veya antibiyotik içermeyen ortamda inkübe olmuş kültür).



Şekil 4.39: Ananas kabuğu etanol (ACE), su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamaları ile *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme ve süzülme hareketlerinin inhibisyonu (%). Belirlenen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.12. Ekstrakt uygulamalarının hücre zar potansiyeline etkileri

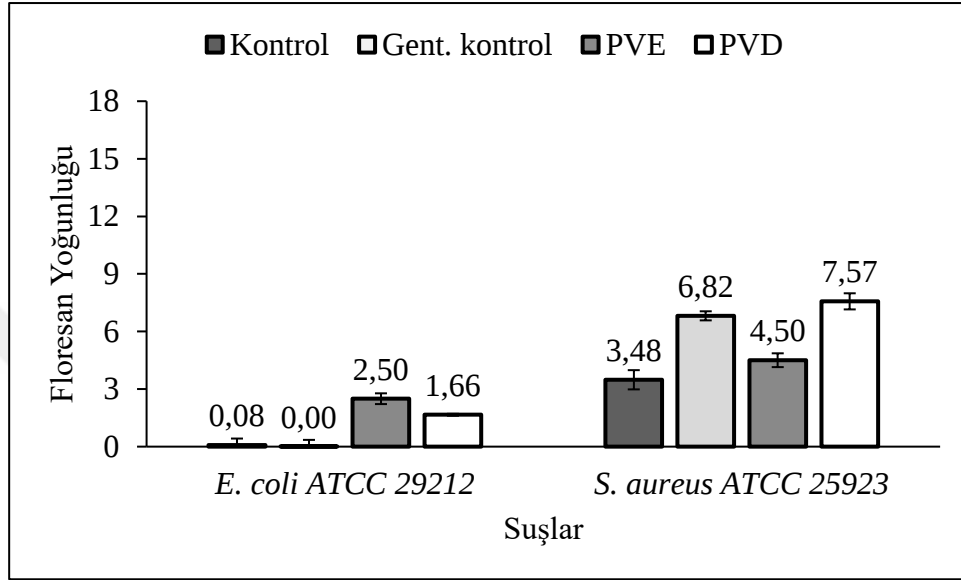
Bu çalışmada, her iki tarımsal atığa ait ekstraktlar (1/8, s/s) ve kontrol olarak kullanılan 100µg/mL gentamisin, Gram negatif *E. coli* ATCC 29212 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşlarında hücre zar potansiyelini depolarizasyon yönünde farklı seviyelerde etkilediği görüldü.

4.12.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının hücre zar potansiyeline etkileri

E. coli ATCC 29212 suşunda hücre zar potansiyeli PVE ve PVD ekstraktları uygulaması sonrası floresan yoğunluğun artmasının işaret ettiği depolarizasyon yönünde değiştiği görüldü. *E. coli* ATCC 29212 suşunda PVE uygulamasının, PVD uygulamasından daha yüksek depolarize edici etkiye sahip olduğu saptandı. Antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının, *E. coli* ATCC 29212 suşunda belirgin bir zar potansiyeli değişimine neden olmadığı görüldü.

S. aureus ATCC 25923 suşunda hücre zar potansiyeli PVE ve PVD ekstraktları uygulaması sonrası benzer şekilde floresan yoğunluğun artmasının işaret ettiği

depolarizasyon yönünde değiştiği belirlendi. *S. aureus* ATCC 25923 suşunda PVD uygulaması PVE uygulamasından daha yüksek depolarize edici etkiye sahip olduğu görüldü. PVD ekstraktı neredeyse antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının etki ettiği kadar zar potansiyelini depolarizasyon yönünde etkilediği belirlendi (Şekil 4.40).



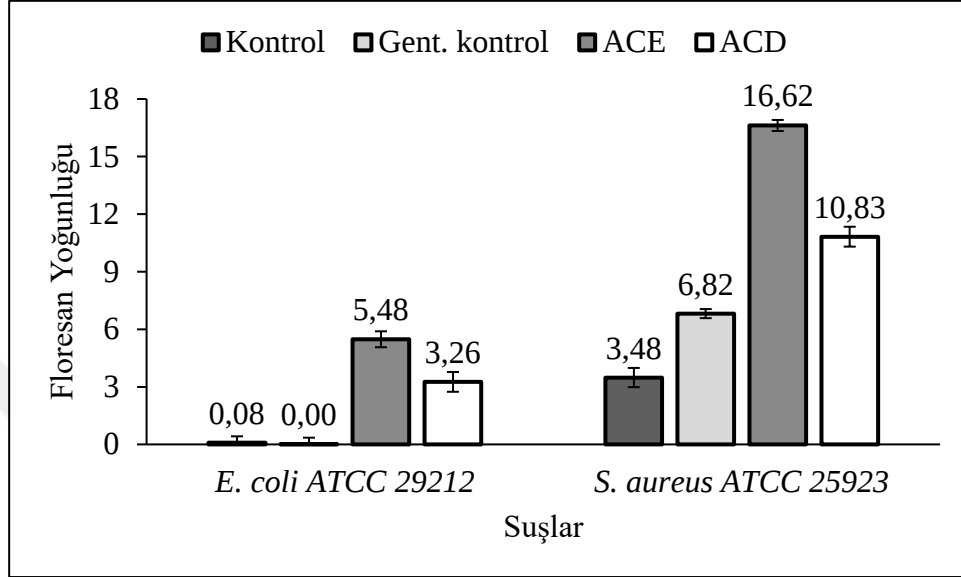
Şekil 4.40: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının hücre zar potansiyeline etkisi (Kontrol: Ekstrakt veya antibiyotik içermeyen ortamda inkübe olmuş kültürler). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.12.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının hücre zar potansiyeline etkileri

E. coli ATCC 29212 suşunda hücre zar potansiyeli ACE ve ACD ekstraktları uygulaması sonrası floresan yoğunluğun artmasının işaret ettiği depolarizasyon yönünde değiştiği görüldü. *E. coli* ATCC 29212 suşunda ACE uygulaması ACD uygulamasından daha yüksek depolarize edici etkiye sahip olduğu saptandı. Antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulaması, *E. coli* ATCC 29212 suşunda belirgin bir zar potansiyeli değişimine neden olmadığı belirlendi.

S. aureus ATCC 25923 suşunda hücre zar potansiyeli ACE ve ACD ekstraktları uygulaması sonrası benzer şekilde floresan yoğunluğun artmasının işaret ettiği depolarizasyon yönünde değiştiği belirlendi. *S. aureus* ATCC 25923 suşunda ACE

uygulaması ACD uygulamasından daha yüksek depolarize edici etkiye sahip olduğu görüldü. Ananas kabuğu ekstraktları antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının etki ettiğinden çok daha fazla oranda zar potansiyelini depolarizasyon yönünde etkilediği saptandı (Şekil 4.41).



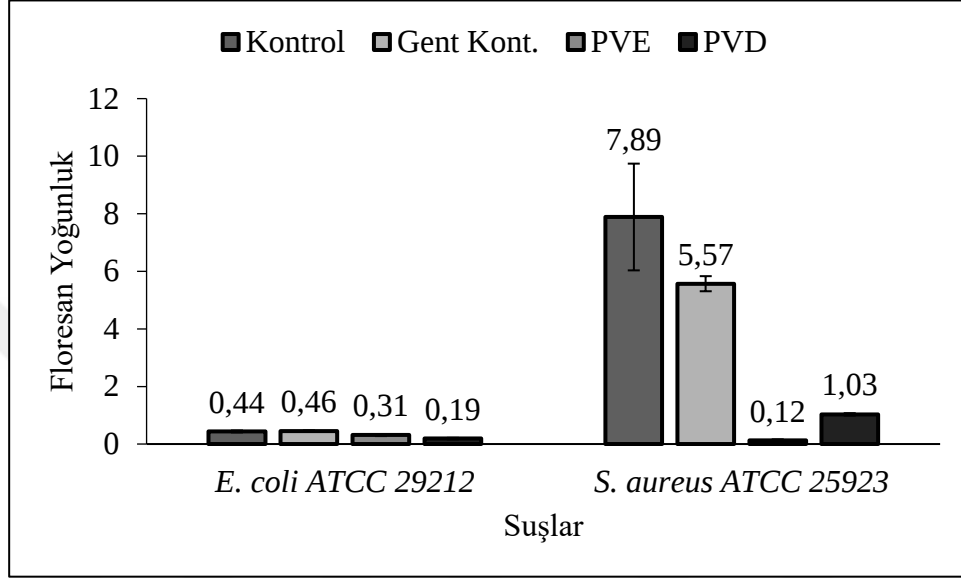
Şekil 4.41: Ananas kabuğu etanol (ACE), su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının hücre zar potansiyeline etkisi (Kontrol: Ekstrakt veya antibiyotik içermeyen ortamda inkübe olmuş kültürler). Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.13. Ekstrakt uygulamalarının sitoplazmik pH üzerine etkileri

4.13.1. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının sitoplazmik pH üzerine etkileri

E. coli ATCC 29212 suşunda sitoplazmik pH (pH_{int}) değerinin, PVE ve PVD ekstraktları uygulaması sonrası büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında düşüş gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$). PVD uygulaması *E. coli* ATCC 29212 suşunun pH_{int} değerini PVE uygulamasından daha çok düşürücü etki gösterdi ($p < 0.05$). Antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının, *E. coli* ATCC 29212 suşunda belirgin bir pH_{int} değeri değişimine neden olmadığı görüldü ($p > 0.05$). (Şekil 4.42).

S. aureus ATCC 25923 suşunda sitoplazmik pH (pH_{int}) PVE ve PVD ekstraktları uygulaması sonrası büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında düşüş gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). PVE uygulaması *S. aureus* ATCC 25923 suşunun pH_{int} değerini PVD uygulamasından daha çok düşürücü etki gösterdi ($p<0.05$). Antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının, *S. aureus* ATCC 25923 suşunda önemli bir pH_{int} değeri değişimine neden olduğu görüldü ($p>0.05$) (Şekil 4.42).



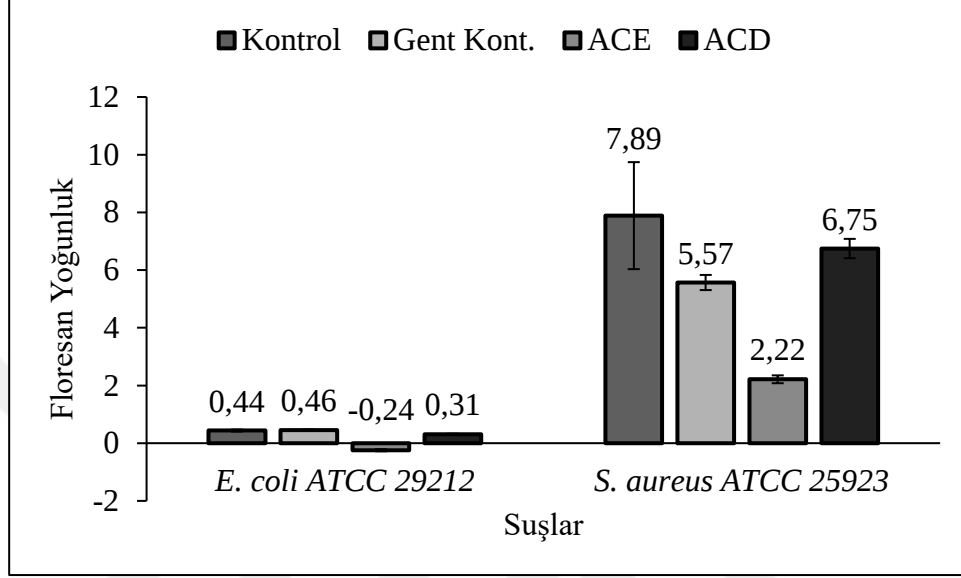
Şekil 4. 42: Fıstık dış pembe kabuğu etanol (PVE) ve su (PVD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının sitoplazmik pH (pH_{int}) üzerine etkisi. Değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.13.2. Ananas kabuğu ekstraktlarının sitoplazmik pH üzerine etkileri

E. coli ATCC 29212 suşunda sitoplazmik pH (pH_{int}) ACD ekstraktları uygulaması sonrası büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında düşüş gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). ACE uygulaması *E. coli* ATCC 29212 suşunun pH_{int} değerini ACD uygulamasından daha çok düşürücü etki gösterdi ($p<0.05$). Antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının, *E. coli* ATCC 29212 suşunda belirgin bir pH_{int} değeri değişimine neden olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Şekil 4.43).

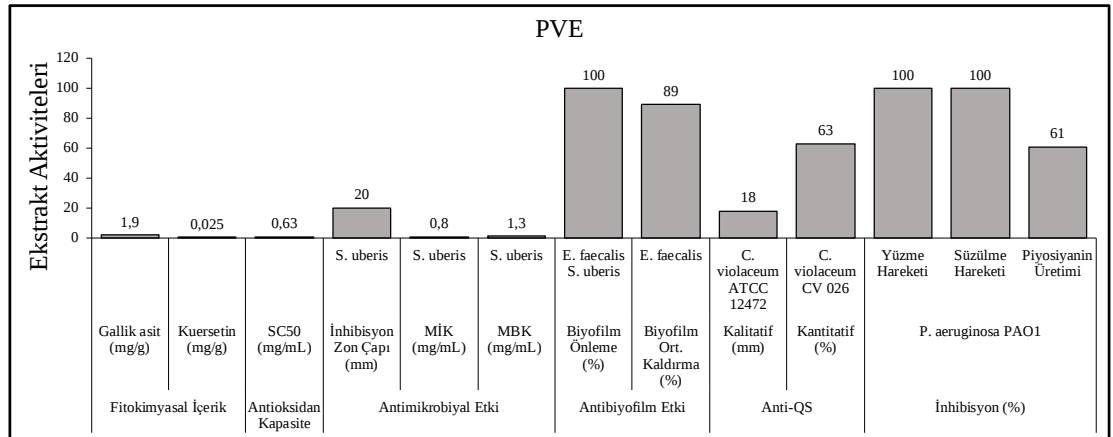
S. aureus ATCC 25923 suşunda sitoplazmik pH (pH_{int}) ACE ve ACD ekstraktları uygulaması sonrası büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında düşüş gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). ACE uygulamasının *S. aureus* ATCC 25923 suşunda pH_{int} değerini düşürmede belirgin bir etkiye sahip olduğu saptandı ($p<0.05$). Fakat ACD uygulaması,

büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında pH_{int} değerini düşürmede önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Antimikrobiyal etki kontrolü olan gentamisin uygulamasının, *S. aureus* ATCC 25923 suşunda ACD ekstraktından daha yüksek pH_{int} değeri düşüşüne neden olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.43).

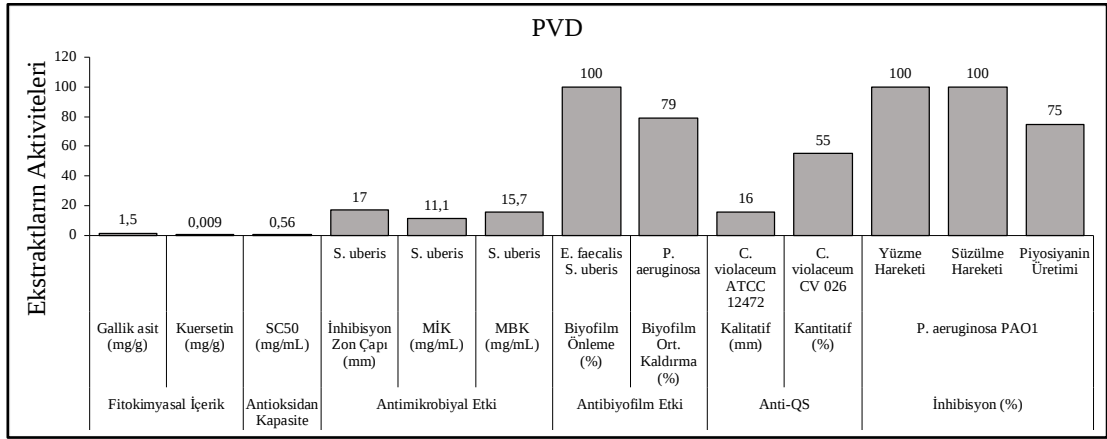


Şekil 4.43: Ananas kabuğu etanol (ACE) ve su (ACD) ekstraktları (1/8, s/s) ve gentamisin (100 µg/mL) uygulamalarının sitoplazmik pH (pH_{int}) üzerine etkisi. Belirlenen değerler en az üç bağımsız uygulamanın ortalamalarına aittir. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

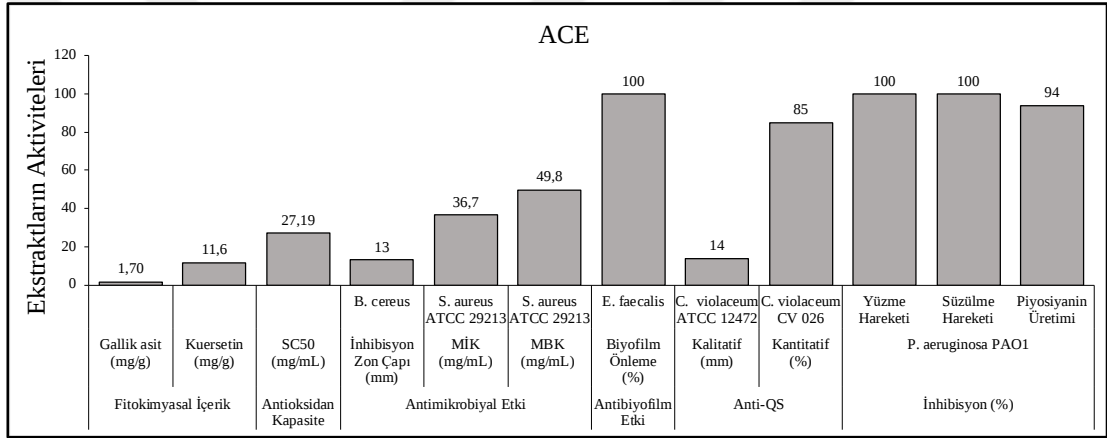
Fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktları ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafikler Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.46 ve Şekil 4.47’de sunulmuştur.



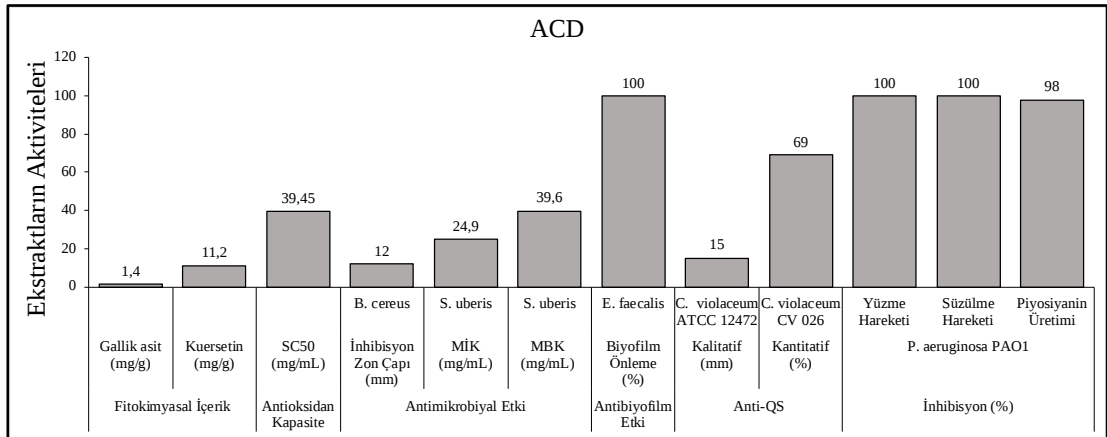
Şekil 4.44: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı (PVE) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.



Şekil 4.45: Fıstık dış pembe kabuğu su ekstraktı (PVD) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.



Şekil 4.46: Ananas kabuğu etanol ekstraktı (ACE) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.

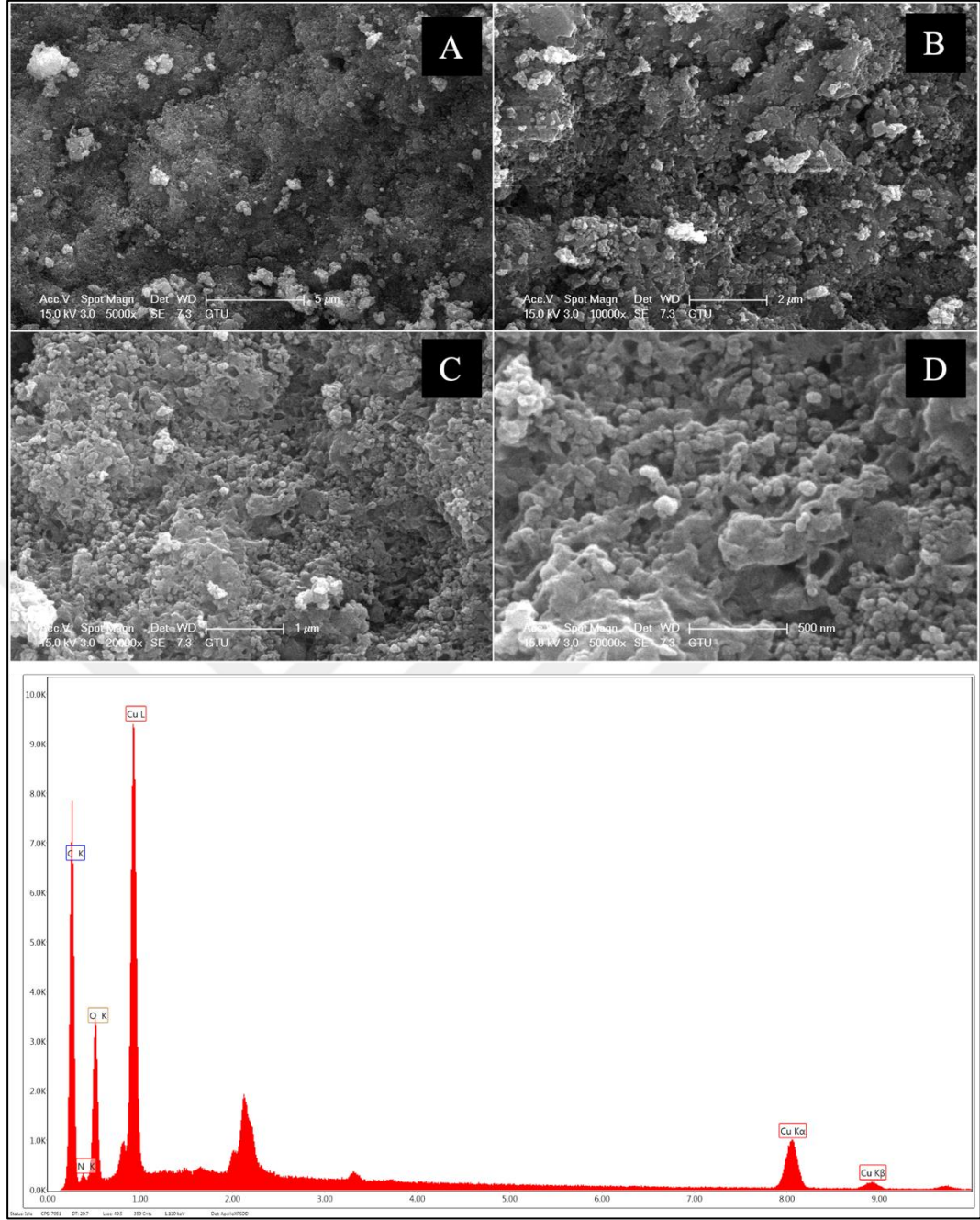


Şekil 4.47: Ananas kabuğu su ekstraktı (ACD) ile elde edilen en yüksek sonuçlara ait özet grafik.

4.14. Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliği ve karakterizasyonu

4.14.1. Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu

SEM-EDS analizleri sonucunda PVE ekstraktı ile sentezlenen nanopartiküllerin Cu nanopartikülü olduğu doğrulandı. Şekil 4.48’de Cu-NP’lerin SEM görüntüleri ve EDS spektrumları gösterildi. EDS aracılığı ile yapılan kantitatif analizlerle, bakır bölgesinde güçlü Cu sinyallerinin alınması CuNP’lerin oluşumunu doğrulamaktadır. Elde edilen SEM görüntüleri le PVE-NP’lerin amorf yapıda olduğu ve büyüklüklerinin 24-35 nm büyüklüğünde olduğu belirlendi.



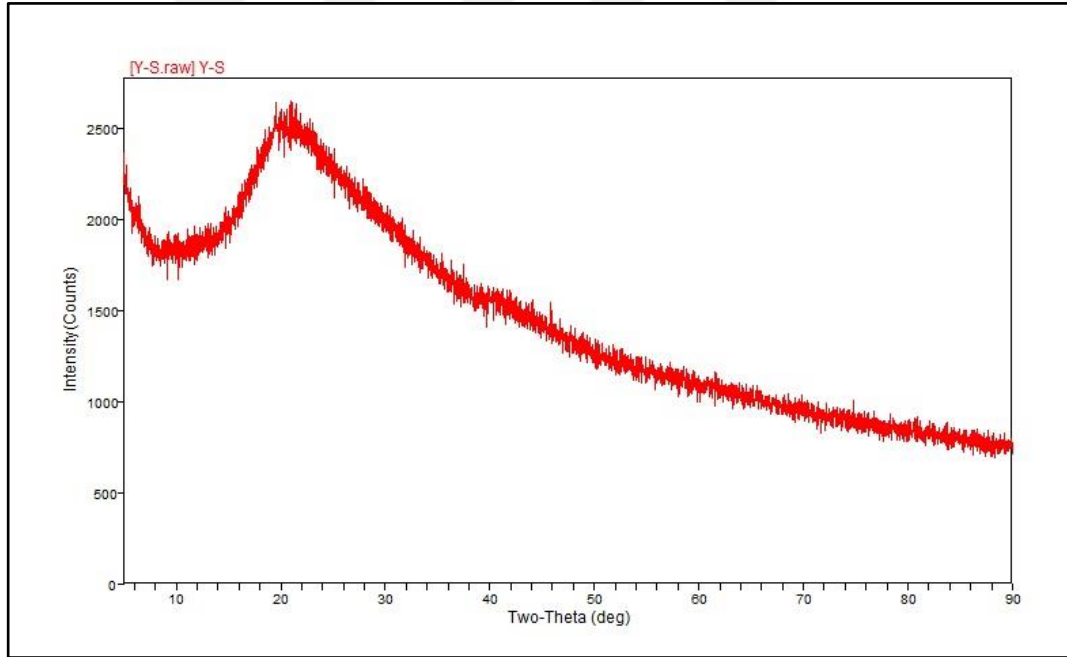
Şekil 4.48: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile hazırlanan bakır nanopartiküllerin (PVE-NP) taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (A: 5.000x, B:10.000x, C: 20.000x, D: 50.000x) ve EDS spektrumları.

PVE-NP'lere ait EDS analizi ile elde edilen elementel kompozisyonu sonuçları Çizelge 4.12'deki gibidir. EDS spektrumu ile kompozit içerisinde C, N, O ve Cu olduğu ortaya koyuldu.

Çizelge 4.12: PVE-NP'lerin elementel kompozisyonu.

Element	Ağırlık (%)	Atomik (%)	Net İnt.	Net İnt. Hata
C K	44.41	65.36	885.18	0.01
N K	4.61	5.82	29.98	0.06
O K	17.71	19.57	416.46	0.01
CuK	33.26	9.25	302.38	0.01

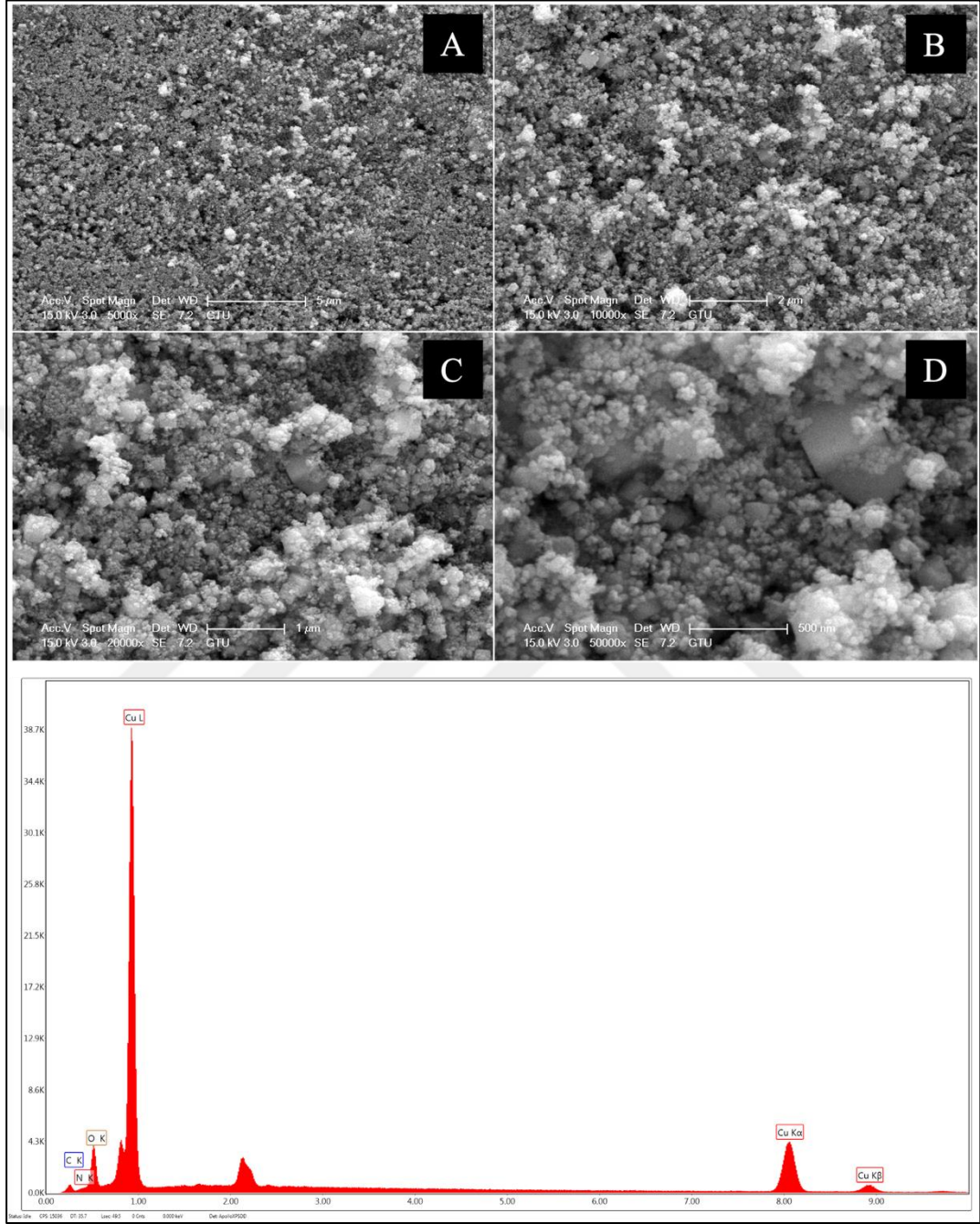
Gerçekleştirilen XRD analizleri sonucunda, PVE-NP uygulamasında 2θ 'da yaklaşık 22° pozisyonunda görülen büyük geniş pikin selülozdan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bakır bölgesinde pik görülmemiş olması, SEM-EDS analizleri sonucu var olduğu belirlenen nanopartiküllerin kristal yapıda oluşmadığını göstermektedir (Şekil 4.49).



Şekil 4.49: PVE-NP'lere ait XRD spektrumu.

Sodyum borhidrür aracılı gerçekleştirilen bakır nanopartikülü sentezine ait SEM-EDS analizleri sonucunda, sentezlenen nanopartiküllerin Cu nanopartikülü olduğu belirlendi. Şekil 4.50'de CuSB-NP'lerin SEM görüntüleri ve EDS spektrumları gösterildi. EDS aracılığı ile yapılan kantitatif analizlerle, bakır bölgesinde güçlü Cu sinyallerinin alınması CuSB-NP'lerin oluşumunu doğrulamaktadır. Elde edilen SEM

görüntüleri le PVE-NP'lerin amorf yapıda olduğu ve büyüklüklerinin 17-24 nm büyüklüğünde olduğu belirlendi.

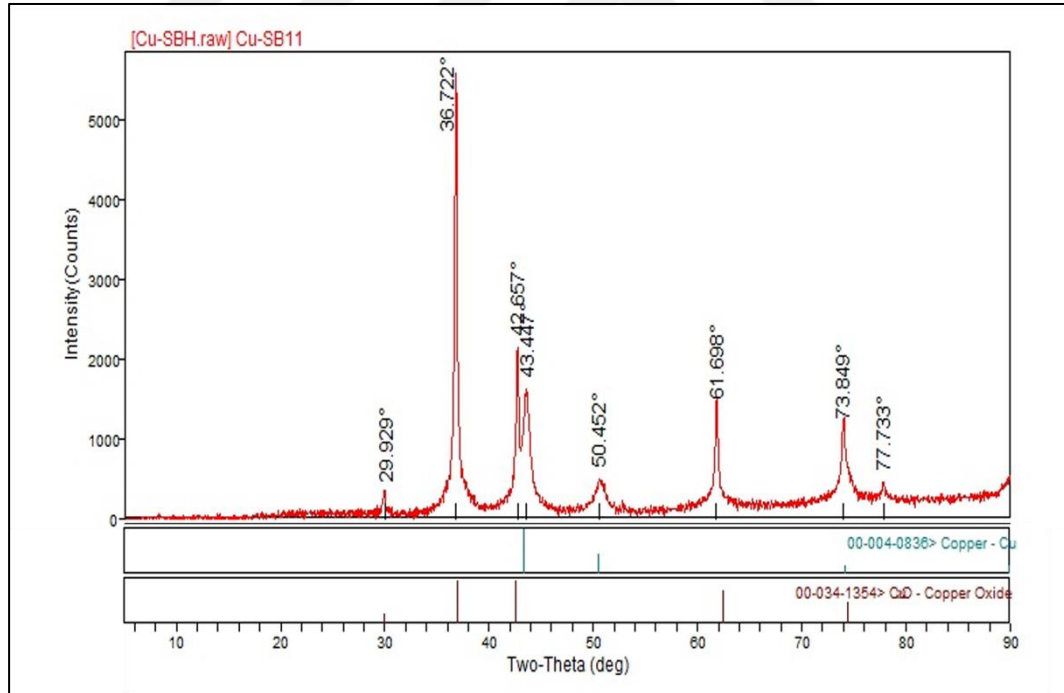


Şekil 4.50: Sodyum borhidrür aracılı hazırlanan bakır nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (A: 5.000x, B:10.000x, C: 20.000x, D: 50.000x) ve EDS spektrumları.

Çizelge 4.13: CuSB-NP'lerin elementel kompozisyonu.

Element	Ağırlık (%)	Atomik (%)	Net İnt.	Net İnt. Hata
C K	4.92	17.42	82.2	0.02
N K	1.69	5.11	34.78	0.06
O K	7.56	20.08	483.42	0.01
CuK	85.83	57.39	1307.33	0.01

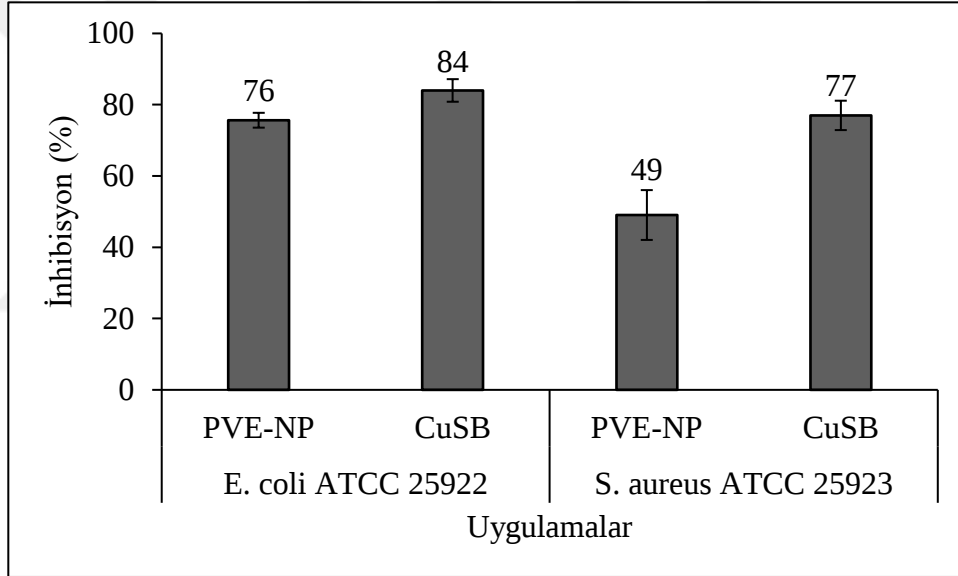
Gerçekleştirilen XRD analizleri sonucunda, CuSB-NP uygulaması ile metalik bakır ve CuO formunda nanopartiküllerin elde edildiği görüldü. 2θ 'da 29.9° , 43.4° , 50.5° , ve 73.8° pozisyonunda görülen piklerin metalik bakıra ait olduğu belirlendi. 2θ 'da 36.7° , 42.6° , ve 61.7° pozisyonlarında görülen piklerin ise CuO nanopartiküllerine ait olduğu saptandı (Şekil 4.51).



Şekil 4.51: CuSB-NP'lere ait XRD spektrumu.

4.14.2. Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı ile elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliği

Mikrotitrasyon plakasında gerçekleştirilen çalışma sonucunda bakır nanopartiküllerin (CuN) 1000 µg/mL konsantrasyonda önemli derecede antimikrobiyal etki gösterdiği belirlendi. *E. coli* ATCC 25922 suşunun büyümesini %76 oranında, *S. aureus* ATCC 25923 suşunun büyümesini ise %49 oranında inhibe ettiği saptandı. Sodyum borhidrür aracılı sentezlenen bakır nanopartiküllerin ise *E. coli* ATCC 25922 suşunun büyümesini %84 oranında, *S. aureus* ATCC 25923 suşunun büyümesini ise %77 oranında inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.52). Bir gecelik inkübasyon sonunda PVE ekstraktı ile *S. aureus* ATCC 25923 suşunda %100 inhibisyon gözlenirken, *E. coli* ATCC 25922 suşunda inhibisyona neden olmadığı belirlendi.



Şekil 4.52: Fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktı (PVE-NP) ve sodyum borhidrür aracılı hazırlanan (CuSB) bakır nanopartiküllerin (1000 µg/mL) antimikrobiyal etkinliği (% inhibisyon).

5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Mikrobiyal kontaminasyonun sorun olduğu birçok alanda bu sorunu kontrol etmede veya ortadan kaldırmada genellikle çevreyi kirleten kimyasal yöntemler veya büyük enerji sarfiyatına neden olan fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Tam anlamıyla başarıyı sağlamada zaman zaman yetersiz kalabilen bu yöntemler yerine, doğal içerik sağlayan bitkisel ekstraktların kullanımına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Halihazırda besin olarak tüketilen meyve veya sebzelerin kullanımının yanında atıklarının da biyoaktif ekstraktlar eldesinde kullanılması farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Tüketicilerin satın aldıkları ürünlerde temiz içerik talebinin artması ile bu tür bitkisel ekstraktlar veya ekstraktlar kullanılarak üretilen ve işlenen ürünlere de talebin arttığı görülmektedir. Daha bilinçli tüketim alışkanlıklarını kazanan günümüz insanların bu ihtiyacını karşılamak amacıyla sanayiciler ve bilim insanları ayrıntılı çalışmalarda bulunmaktadır. Ancak sadece herhangi bir bitkisel materyalden bir ekstrakt elde edip pazara veya kullanıma sunmak yeterli olmayacaktır. Örneğin bir ekstraktın fitokimyasal içeriğinin, varsa antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve etki ettiği biyolojik mekanizmaların aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının birçok alanda sorun olduğu bilinen bazı patojen bakterilerin biyokontrolünde kullanım kapasiteleri değerlendirilmiştir. Ekstraktların fitokimyasal içerikleri, antioksidan kapasiteleri, antimikrobiyal, antibiyofilm, anti-QS etkinliklerinin yanında bakteriyel hareketi (yüzme ve süzülme), biyofilm ilişkili bazı pigmentlerin (piyosiyanın) üretimine etkileri, test bakterilerinde hücre zar potansiyeli ve sitoplazmik pH değerine etkilerini belirlemek üzere bazı testler gerçekleştirilmiştir. Son olarak, fıstık dış pembe kabuğu etanol ekstraktının indirgeyici özelliğinden faydalanılarak bakır nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiş ve elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu ve antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiştir.

5.1.1. Ekstraktların özellikleri ve fitokimyasal içerik

Ekstraktlar içerdikleri kuru madde miktarı açısından incelenmiştir. Fıstık kabuğu ekstraktlarından PVE ekstraktının (329.0 ± 4.24 mg/mL) PVD ekstraktından daha

yüksek miktarda (240.5 ± 13.44 mg/mL) kuru madde içerdiği belirlenmiştir. Etanol ile ekstraksiyonun fıstık dış pembe kabuğundan daha fazla kuru madde elde edilmesine sebep olduğu görülmüştür. Ananas kabuğu ekstraktlarından ACE (382.5 ± 21.92 mg/mL) ve ACD (354.0 ± 5.66 mg/mL) ekstraktlarının kuru madde miktarları arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır.

Antimikrobiyal etki sağlamaları açısından bitkisel ekstraktların pH değerleri önemli bir etkiye sahiptir. Hücre içi veya hücre dışı ortamı düşük veya yüksek pH'a maruz bırakmaları ile hücre geçirgenliğini değiştirme potansiyelleri ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla ekstraktlar pH değerleri açısından değerlendirilmiştir. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarından PVE ve PVD ekstraktlarının pH değerlerinin (sırasıyla 5.44 ve 5.32) arasında önemli ($p > 0.05$) bir fark olmadığı görülmüştür. Ananas kabuğu ekstraktları için de, ACE ve ACD ekstraktlarının pH değerlerinin (sırasıyla 3.63 ve 3.70) arasında önemli ($p > 0.05$) bir farkın olmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak, ekstraksiyonda etanol veya su kullanılmasının ekstraktların pH değerlerini etkilemediği görülmüştür.

Bitkisel ekstraktlardan elde edilmesi hedeflenen biyoaktivitelerin kaynağının içerdikleri sekonder metabolitler olan fitokimyasal bileşikler olduğu bilinmektedir. Fitokimyasal miktarının yüksek olmasının yanında aynı zamanda fitokimyasal bileşik çeşitliliğinin de yüksek olması önemlidir. Böylece antimikrobiyal etki amaçlandığında mikroorganizmaların çoklu mekanizmalarına farklı bileşiklerle saldırarak etkinlik artırılabilir. Bu amaçla çalışmadaki bitkisel ekstraktların fitokimyasal içerikleri aydınlatılmıştır.

Ekstraksiyonda çözücü türü ekstraksiyon verimini önemli derecede etkilemektedir. Bu tez çalışmasında, fıstık dış pembe kabuğundan ekstrakt elde etmede etanol çözeltisi kullanmanın, su ile karşılaştırıldığında toplam fenolik bileşiklerin miktarını arttırmada etkili olduğu görülmüştür. PVE ve PVD ekstraktlarının toplam fenolik içeriklerinin sırasıyla 23.3 ± 2.63 mg GAE/g ve 14.7 ± 1.45 mg GAE/g olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.1). Elde edilen sonuçların literatürdeki bazı önceki çalışmalarla da uyum gösterdiği belirlenmiştir. Özbek et al. (2020), MAE ile elde edilen fıstık dış kabuğu su ve etanol (%60 s/s) ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının sırasıyla yaklaşık 28 ve 35 mg GAE/g kuru ağırlık (%25 daha yüksek) olduğunu belirtmiştir. Fernández-Agulló et al. (2013) da ceviz yeşil kabuğunun etanol ekstraktını (%50, s/s) ile sulu ekstraktından daha yüksek miktarda toplam fenolik madde elde ettiğini rapor etmiştir. Ancak, Goli et al. (2005), üç çözücü (su, metanol ve etil asetat) ve iki yöntem

(manyetik karıştırma ile çözücü ekstraksiyonu ve UAE) kullanarak suyun fıstık dış kabuğu ekstraksiyonunda en etkili çözücü olduğunu bulmuş ve en yüksek toplam fenolik madde miktarını su ekstraktı ile elde ettiğini belirtmiştir (34.7 mg tannik asit eşdeğeri, TAE g/kuru ağırlık). Bir başka çalışmada fıstık dış kabuğu ekstraktları, UAE kullanılarak 1-3 saat boyunca su, etanol ve butanol gibi çözücüler kullanılarak elde edilmiş ve tüm uygulamalarında en yüksek toplam fenolik madde içeriğini sağlayan çözücünün su olduğu belirlenmiştir [Garavand et al., 2017].

Bu tez çalışmasında, PVE ekstraktındaki toplam flavonoid içeriğinin (5.0 mg KE/g kuru ağırlık), PVD ekstraktındakinden (2.9 KE/g kuru ağırlık) %72.4 daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Çizelge 5.1). Daha önce, dondurulmuş fıstık dış kabuğunun (3 g) oda sıcaklığında metanol ve etanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinin sırasıyla 0.69 KE/g kuru ağırlık ve 0.34 KE/g kuru ağırlık olduğu bir çalışmada rapor edilmiştir [Barreca et al., 2016]. Bu durum, ekstraksiyonda MAE gibi ekstraksiyon etkinliğini artırıcı uygulamaların da önemli olduğunu göstermektedir.

Gerçekleştirilen HPLC analizleri sonunda, ekstraktlardaki gallik asit ve kuersetin miktarları belirlenmiştir. Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit), genellikle kırmızı meyvelerde bulunan yaygın bir polifenoldür [Hidalgo and Almajano, 2017]. Bu çalışmada, PVE ekstraktındaki gallik asit miktarı (1.9 mg/g kuru ağırlık), PVD ekstraktındakinden (1.5 mg/g dw kuru ağırlık) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.1). Bazı çalışmalarda, bu çalışmadan elde edilenden daha fazla olacak şekilde %60 (s/s) etanolik, %100 metanolik ve %80 (s/s) etanolik fıstık dış kabuğu ekstraktlarının sırasıyla 13.25 mg/g, 10 mg/g ve 6.72 mg/g gallik asit içerdiği bulunmuştur [Kilic et al., 2016; Özbek et al., 2020; Karaoglu and Tarhan, 2022].

PVE ekstraktındaki kuersetin miktarının (0.025 mg/g kuru ağırlık), PVD ekstraktındakinden (0.009 mg/g kuru ağırlık) neredeyse üç kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.1). Ancak, Seeram et al. (2006), asidik metanol çözeltisi ve ultrasonikasyon kullanarak 30 dakika süreyle elde edilen fıstık dış kabuğu ekstraktında mevcut tez çalışmasında bulunandan daha düşük miktarda (14.9 µg/g) kuersetin tespit etmiştir.

TPC ve TFC içeriği yüksek olduğu belirlenen PVE ekstraktının içeriği HPLC analizleri ile aydınlatılmıştır. Kateşin (0.025 mg/g), kafeik asit (0.027 mg/g),

epikateşin (0.712 mg/g), p-kumarik asit (0.048 mg/g) ve ellajik asit (0.322 mg/g) gibi önemli fitokimyasalların varlığı PVE ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca PVE ve PVD ekstraktlarında kinon, kumarin ve tanen bulunduğu biyokimyasal testlerle belirlenmiştir. Bu bileşenlere ek olarak, PVE ekstraktında saponin bulunduğu da saptanmıştır (Çizelge 5.1). Çeşitli organik çözücüler (etanol, metanol ve saf su), ekstraksiyonu hızlandıran ve güçlendiren yöntemler olan ultrasonik ses destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), oda sıcaklığında çalkalama inkübasyonu gibi yöntemler kullanılarak fıstık dış kabuğundan değerli fitokimyasalların ekstrakte edilebildiği görülmüştür. Özbek et al. (2020), etanol çözeltisi (% 50, s/s) kullanarak mikrodalga destekli ekstraksiyon gerçekleştirmiş ve bu çalışmada, (-)-epikateşin ($873 \pm 27 \mu\text{g/g}$ ekstrakt), p-kumarik asit ($52 \pm 2 \mu\text{g/g}$ ekstrakt), kuersetin ($41 \pm 1 \mu\text{g/g}$ ekstrakt), kafeik asit ($36 \pm 2 \mu\text{g/g}$ ekstrakt) ve gallik asit ($9340 \pm 341 \mu\text{g/g}$ ekstrakt) elde etmiştir.

Etanolün organik çözücü olarak kullanıldığı bir çalışmada, oda sıcaklığında çalkama (12 saat) ile fıstık dış kabuğu ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta ekstrakt içerisinde gallik asit ($14.50 \pm 0.62 \mu\text{g/g}$ yaş ağırlık), kateşin ($31.64 \pm 4.53 \mu\text{g/g}$ yaş ağırlık) ve epikateşin ($0.37 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ yaş ağırlık) varlığı belirlenmiştir [Barreca et al., 2016]. Çözücü olarak saf su kullanıldığı çalışmalarda, enzimlerin (17.4 U pektinaz) eklenmesinin [Seifzadeh et al., 2019] ekstraksiyon sırasında enzimsiz ekstraksiyona göre yaklaşık 45 kat daha yüksek fitokimyasal eldesine ($53.6 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$) neden olduğu gözlemlenmiştir [Fattahifar et al., 2018]. Fıstık dış kabuğunun pektin bakımından zengin olduğu bilinmektedir [Arjeh et al., 2020]. Bu nedenle, yüksek verimli ekstraksiyon amaçlandığında, pektinazın uygun konsantrasyonlarda kullanımı ile ekstraksiyonda fitokimyasal verimi artırmak mümkündür.

Çizelge 5.1: Fıstık dış pembe kabuğu fitokimyasal içerik listesi.

İçerik	Ekstraktlar	
	PVE	PVD
TPC (mg GAE/g)	23.3±2.63	14.7±1.45
TFC (mg KE/g)	5.0±0.54	2.9±0.00
Gallik asit (mg/g)	1.9±0.36	1.5±0.01
Kuersetin (mg/g)	0.025±0.01	0.009±0.01
Glukoz (mg/g)	8.5±0.3	8.6±2.0
Fruktoz (mg/g)	10.5±1.0	10.6±1.0
Sükroz (mg/g)	29.5±2.1	30.3±3.0
Toplam şeker (mg/g)	48.5±5.0	49.5±3.0
Kateşin (mg/g)	0.250	-
Kafeik asit (mg/g)	0.027	-
Epikateşin (mg/g)	0.712	-
p-kumarik asit (mg/g)	0.048	-
Ellajik asit (mg/g)	0.322	-
Kinon	+	+
Kumarin	+	+
Tanin	+	+
Saponin	+	-

Etkili bir ekstraksiyon sağlamak amacıyla ekstraksiyon ön denemelerine tabi tutulan ananas kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriği incelenmiştir. ACE ekstraktının 1.7±0.2 mg GAE/g, ACD ekstraktının ise 1.4±0.4 mg GAE/g toplam fenolik madde içerdiği belirlenmiştir. Dondurularak kurutulan ananas kabuklarının metanol ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriğinin sırasıyla 7.98 mg/g ve 11.1 mg/g olduğu rapor edilmiştir [Jatav et al., 2022]. Toplam flavonoid içeriği tespit edilemeyen ACE ve ACD ekstraktlarının sırasıyla 11.6±3.7 mg/g ve 11.2±1.1 mg/g askorbik asit içerdiği saptanmıştır. Literatürde ananas kabuğu ekstraktlarının toplam flavonoid madde

içerdiği rapor edilen birçok çalışma bulunmaktadır [Namrata et al., 2017; Olakunle et al., 2019; Gani Soulissa et al., 2021; Owoeye et al., 2022]. Jatav et al., 2022'nin çalışmasında metanol ekstraktının 2.37 mg/g, etanol ekstraktının ise 3.86 mg/g toplam flavonoid madde içerdiği bildirilmiştir. Toplam şeker miktarlarının ise ACE ekstraktı için 275.5 ± 18.0 mg/g, ACD ekstraktı için ise 330.1 ± 13.0 mg/g olduğu ölçülmüştür. Daha yüksek miktarda toplam fenolik madde içerdiği görülen ACE için gerçekleştirilen ayrıntılı HPLC analizleri sonucunda gallik asit (0.016 mg/g), kafeik asit (0.124 mg/g), p-kumarik asit (0.135 mg/g) ve ferulik asit (0.022 mg/g) içerdiği de belirlenmiştir. Benzer şekilde Zhou et al. (2023), ananas kabuğu etanol ekstraktında kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit tespit ettiğini belirtmiştir. Ayrıca kinon ve kumarin içerdiği belirlenen ACE ve ACD ekstraktlarının tanin ve saponin içermediği saptanmıştır (Çizelge 5.2). Mevcut çalışmanın sonuçlarının aksine bazı çalışmalarda ananas kabuğu ekstraktlarının tanin ve saponin içerdiği rapor edilmiştir [Gunwantrao et al., 2016; Dabesdor et al., 2017; Namrata et al., 2017; Gani Soulissa et al., 2021; Owoeye et al., 2022].

Çizelge 5.2: Ananas kabuğu fitokimyasal içerik listesi.

İçerik	Ekstraktlar	
	ACE	ACD
TPC (mg GAE/g)	1.7±0.2	1.4±0.4
Askorbik asit (mg/g)	11.6±3.7	11.2±1.1
Glukoz (mg/g)	129.8±20.0	160.6±13.8
Fruktoz (mg/g)	87.2±5.0	131.9±8.4
Sükroz (mg/g)	58.5±5.0	37.6±3.4
Toplam şeker (mg/g)	275.5±18.0	330.1±13.0
Gallik asit (mg/g)	0.016	-
Kafeik asit mg/g	0.124	-
p-kumarik asit mg/g	0.135	-
Ferulik asit mg/g	0.022	-
Kinon	+	+
Kumarin	+	+
Tanin	-	-
Saponin	-	-

Fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarına ait kızılötesi spektrası (FT-IR), 4000-550 cm^{-1} arası taranmıştır. Bu analiz sonunda PVE ekstraktında; fenolik bileşiklerin, alkollerin (3306 cm^{-1} 'deki pikte -OH grupları) [Demiral et al., 2008], aromatik bileşiklerin (1631 cm^{-1} 'deki pikte C=C grupları) [Haque, 2021], aminlerin, amidlerin (1396 cm^{-1} 'de pik oluşturan N-H grupları), alkollerin ve esterlerin (1074 cm^{-1} 'de C-O grupları) [Özay, 2014] içerdiğini göstermektedir. PVD ekstraktından da benzer bölgelerde pik alındığından (1214.8 cm^{-1} 'deki pik hariç) içerik anlamında benzer oldukları düşünülebilir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının FT-IR spektraları sonuçlarının karşılaştırması.

Bileşik Grupları	Ekstraktlar	
	PVE	PVD
-OH	3306.4 cm ⁻¹	3306 cm ⁻¹
C=C	1631.8 cm ⁻¹	1633.5 cm ⁻¹
N-H	1396 cm ⁻¹	1399.3 cm ⁻¹
C-O	1214.8 cm ⁻¹	-
C-O	1074.1 cm ⁻¹	1074.8 cm ⁻¹

Ananas kabuğu ekstraktlarında ise ACD ekstraktının içerik çeşitliliği açısından ACE ekstraktından daha zengin olduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen FT-IR analizli sonunda ACD ekstraktında fenolik bileşiklerin, alkollerin (3298.3 cm⁻¹'deki pikte -OH grupları) [Demiral et al., 2008], aromatik bileşiklerin (1637.2 cm⁻¹'deki pikte C=C grupları) [Haque, 2021], aminlerin, amidlerin (1413.4 cm⁻¹'de pik oluşturan N-H grupları), alkollerin, esterlerin (1275, 1269 ve 1051 cm⁻¹'de C-O grupları) [Özay, 2014] ve karboksil grupları (749.6 cm⁻¹'de C-O grupları) içerdiğini göstermektedir (Çizelge 5.4) [Lubaina et al., 2019].

Çizelge 5.4: Ananas kabuğu ekstraktlarının FT-IR spektraları sonuçlarının karşılaştırması.

Bileşik Grupları	Ekstraktlar	
	ACE	ACD
-OH	3298.9 cm ⁻¹	3298.3 cm ⁻¹
C=C	1637.2 cm ⁻¹	1637.2 cm ⁻¹
C-H/N-H	-	1413.4 cm ⁻¹
C-O	-	1275.3 cm ⁻¹
C-O	1259.8 cm ⁻¹	1269.5 cm ⁻¹
C-O	1049.8 cm ⁻¹	1051.0 cm ⁻¹
C-H	-	749.6 cm ⁻¹

5.1.2. Antioksidan kapasite

Antioksidan etkinlik bulunduğu antioksidan ajanın kullanılacağı alana göre önem teşkil eden bir özelliktir. Genellikle oksidasyona maruz kalacak materyallerin yapılarını korumak amacıyla kullanılan antioksidanlar sentetik ajanlardan tercih edilmektedir. Fakat değişen kullanıcı tercihleri nedeni ile artık daha “yeşil” yöntemler ile elde edilen antioksidanlar ile ilgili farkındalık artmakta, bu durum da talebi arttırmaktadır. Bu nedenle bitkisel ekstraktların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu amaçla tez çalışması kapsamında çalışılan fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri incelenmiştir.

PVE ve PVD ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, DPPH radikalini süpürme oranı incelenerek belirlenmiştir. PVE ve PVD ekstraktlarının SC₅₀ değerlerinin sırasıyla 0.63 mg/mL ve 0.56 mg/mL olduğu ve benzer seviyelerde antioksidan kapasiteye sahip oldukları görülmüştür. Benzer bir çalışmada, fıstık dış kabuğu ekstraktının etanol (%60 s/s) ve su ekstraktlarının sırasıyla 0.8 mg/mL ve 1.0 mg/mL SC₅₀ değerlerine sahip olduğu rapor edilmiştir [Özbek et al., 2018].

Genel olarak, PVE ekstraktının fitokimyasal içeriği ve antioksidan kapasitesi, PVD ekstraktı ile elde edilenlerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çözücü tipi [Jakopič et al., 2009] ve konsantrasyonları, kuru bitki materyalinin miktarı, fıstık çeşidindeki farklılık, fıstığın yetiştirme koşulları, hasat edilen meyvenin olgunluk derecesi veya ekstraksiyon yöntemleri, ekstraksiyon prosedürleri sırasında fitokimyasal konsantrasyonlarındaki değişikliklere neden olabilir. Sonuç olarak, ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol çözeltisinin (%60, s/s) kullanılmasının, ekstraksiyon için yalnızca su kullanılması ile karşılaştırdığında fitokimyasal içeriği arttırmada etkili olduğu söylenebilir.

ACE ve ACD ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, DPPH radikalini süpürme oranı incelenerek belirlenmiştir. ACE ve ACD ekstraktlarının SC_{50} değerlerinin sırasıyla 27.19 mg/mL ve 39.45 mg/mL olduğu saptanmıştır. Kuru ve yaş ananas kabukları ile yapılan bir başka çalışmada, farklı miktarlarda etanol ve su içeren ekstraksiyon çözeltilerinin etkisi incelendiğinde en yüksek antioksidan kapasitenin su ekstraktında olduğu görülmüştür. Su ekstraktının kuru ananas kabuğu ile hazırlananı ile IC_{50} değerinin 0.8-1.3 mg/mL, yaş kabuk ile hazırlananı ile IC_{50} değerinin 0.25-0.5 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Kurutmanın antioksidan etkinliği olumlu etkilediği görülmüştür [Saraswaty et al., 2017]. Bir başka çalışmada, farklı sıcaklıklarda kurutulan ananas kabukları ile elde edilen %70 (s/s) metanol ekstraktlarının IC_{50} değerleri incelendiğinde ise antioksidan kapasitesi en yüksek ekstraktın 60 °C sıcaklıkta kurutulan kabuklarla hazırlanan ekstrakt ($IC_{50}=0.448$ mg/mL) olduğu belirtilmiştir [Dewi and Simamora, 2023].

5.1.3. Antimikrobiyal etki

Fitokimyasal içeriğin zenginliği ve antioksidan kapasitenin yüksek olması, çeşitli biyoaktivitelere neden olabilmektedir. Tez çalışması kapsamında özellikle antimikrobiyal, antibiyofilm ve anti-QS etki hedefli mekanizmalar incelenmiştir. Halihazırdaki çalışmalar da incelendiğinde, fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının bu konuda yüksek potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, ekstraktlar antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirebilmek amacıyla agar kuyu difüzyonu, MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi ve ekstraktların bakterilerde zamana bağlı büyümeye etkisi incelenmiştir.

P. vera L. pembe kabuklarında var olduğu belirlenen polifenoller ve flavonoidler, patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteler sergilemiştir [Bisignano et al., 2013]. Bu çalışmada, PVE ve PVD ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarındaki antimikrobiyal aktiviteleri, kuyu difüzyonu yöntemi ile 24 saat süren inkübasyon sonrasında oluşan inhibisyon bölgelerinin çaplarını (mm) ölçerek bazı gıda patojenleri üzerinde araştırılmıştır. Ekstraktlarla yapılan işlem, tüm test edilen suşlar üzerinde doza bağlı bir şekilde inhibe edici etkiler oluşturmuştur. PVE ekstraktı, tüm konsantrasyonlarda (*B. subtilis* ATCC 6633 hariç) test bakterileri üzerinde PVD ekstraktından daha etkili olmuştur. PVE ve PVD ekstraktlarına karşı en dirençsiz bakterinin *S. uberis* ATCC 700407 olduğu, en dayanıklı suşun ise *B. subtilis* ATCC 6633 olduğu görülmüştür. *E. faecalis* ATCC 29212, gentamisin dirençli bir suş olarak bilinmektedir [Azzam et al., 2023]. PVE ve PVD ekstraktlarının *E. faecalis* ATCC 29212'ye karşı (sırasıyla 19 mm ve 16 mm) elde edilen inhibisyon zonları, 1000 µg/mL gentamisinin (17 mm) elde ettiği inhibisyon çapı değerine yakın olup, fıstık dış kabuğu ekstraktlarının gentamisin uygulaması kadar etkili olduğunu göstermektedir. Daha önce, farklı yöntemlerle elde edilen fıstık dış kabuğu ekstraktlarının *S. aureus*, *B. cereus*, *Streptococcus* spp. suşlarına karşı agar kuyu ve disk difüzyon yöntemleriyle antimikrobiyal aktiviteleri gösterilmiştir [Rajaei et al., 2010; Bagheri et al., 2019; Elhadeef et al., 2021; Salari Sedigh et al., 2021]. Fıstık dış kabuğu su ekstraktının uygulanması, *S. pyogenes* bakterisine karşı 18.67 mm inhibisyon çapı oluşmasına neden olmuştur [Bagheri et al., 2019]. Fıstık dış kabuğu etanol ekstraktı (%80, s/s) ise *S. mutans* bakterisine karşı 11.6 mm inhibisyon çapı oluşumuna neden olmuştur [Salari Sedigh et al., 2021]. Bu değerler bu çalışmadan PVE ve PVD ekstraktları ile *S. uberis* suşuna karşı elde edilen değerlerden (sırasıyla 20 mm ve 17 mm) daha düşüktür. Elhadeef et al. (2019), Rajaei et al. (2010) ve Bagheri et al. (2019), fıstık dış kabuğu su ekstraktı ile *S. aureus* ve *B. cereus* suşlarına karşı sırasıyla mevcut tez çalışmasından elde edilen sonuçlara benzer şekilde, 11.7-18.6 mm ve 11.3-18.8 mm inhibisyon bölgeleri ölçmüşlerdir. Sonuç olarak PVE ve PVD ekstraktlarının bu çalışmada incelenen bakteriler içerisinde Gram pozitif olanlara karşı yüksek antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Ananas kabuğu etanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen agar kuyu difüzyonu uygulaması sonucunda, ACE ve ACD ekstraktlarının farklı seviyelerde Gram pozitif ve Gram negatif tüm test bakterileri

üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. ACE ekstraktı ile en yüksek inhibisyon zon çapı *B. cereus* ATCC 11778 suşuna karşı (13 mm), en düşük inhibisyon zon çapı ise *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. uberis* ATCC 700407 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarına karşı (10 mm) elde edilmiştir. ACD ekstraktı ile ise en yüksek inhibisyon zon çapı *B. cereus* ATCC 11778 suşuna karşı (12 mm), en düşük inhibisyon zon çapı ise Gram negatif bakteriler olan *E. aerogenes* ATCC 13048 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına karşı (7 mm) elde edilmiştir. Farklı çalışmalar ile de ananas kabuğunun çeşitli ekstraktlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği ortaya konulmuştur. Mevcut çalışmaya benzer şekilde bir çalışmada, dondurularak kurutulan ananas kabuklarından metanol ve etanol çözücülerini kullanarak elde edilen ekstraktlar *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi bakterilere karşı test edilmiştir. Bu çalışma sonunda metanol ekstraktı ile 11-16 mm, etanol ekstraktı ile 11-21 mm aralığında inhibisyon zon çapı ölçümleri belirlenmiştir [Jatav et al., 2022]. Oda sıcaklığında kurutulan ananas kabuklarından etanol veya suyun çözücülerini kullanarak ekstraktlar hazırlanan bir başka çalışmada, ekstraktların *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakterilerine karşı etkinliği test edilmiştir. Sonuçta etanol ekstaktı ile 12-15 mm, su ekstraktı ile ise 12-14 mm aralığında inhibisyon zon çalı olduğu rapor edilmiştir [Dabesdor et al., 2017]. Literatür çalışmaları ile birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışma ile ananas kabuğu ekstraktlarının önemli derecede antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu özetlenebilir.

Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktları test bakterilerine farklı konsantrasyonlarda uygulanarak MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. PVE ekstraktına en duyarlı suşun 0.8 mg/mL MİK ve 1.3 mg/mL MBK değerleri ile *S. uberis* ATCC 700407 olduğu görülmüştür. PVD ekstraktına en duyarlı suşun da 11.1 mg/mL MİK ve 15.7 mg/mL MBK değerleri ile *S. uberis* ATCC 700407 olduğu saptanmıştır. Bu ekstraktlara en dayanıklı suşların *Bacillus* cinsinin üyeleri olan *B. subtilis* ATCC 6633 (PVE için; MİK: 49.0 mg/mL, MBK: 99.0 mg/mL) ve *B. cereus* ATCC 11778 (PVD için; MİK: 82.5 mg/mL, MBK: 150.0 mg/mL) suşlarının olduğu belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada, fıstık dış kabuğu methanol (%50, s/s) ve su ekstraktlarının *S. aureus* bakterisine karşı MİK (sırasıyla 1.56 ve 3.12 mg/mL) ve MBK (0.78 ve 1.56 mg/mL) değerleri belirlenmiştir [Bagheri et al., 2019]. Ancak, mevcut çalışmada kullanılan PVE ekstraktının (25.6 mg/mL) *B. cereus* bakterisine karşı elde edilen MİK değeri, %50 (s/s) etanol ekstraktı (6.25 mg/mL) ile elde edilen değerden daha yüksek

olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.5). Ekstraktların MİK ve MBK değerlerindeki farklılıklar, örneklerin bileşimi veya kullanılan ekstraksiyon prosedüründen kaynaklı olabilir.

Çizelge 5.5: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktları (PVE ve PVD) ile elde edilen en yüksek ve en düşük antimikrobiyal etki sonuçları (SU: *S. uberis* ATCC 700407, BS: *B. subtilis* ATCC 6633, BC: *B. cereus* ATCC 11778).

		Ekstraktlar	
Antimikrobiyal Etki		PVE	PVD
İnhibisyon zon çapı (mm)	En yüksek	20 (SU)	17 (SU)
	En düşük	15 (BS)	15 (BS)
MİK (mg/mL)	En yüksek	0.8 (SU)	11.1 (SU)
	En düşük	49.0 (BS)	82.5 (BC)
MBK (mg/mL)	En yüksek	1.3 (SU)	15.7 (SU)
	En düşük	99.0 (BS)	150.0 (BC)

Fenoliklerin yapıları ve lipofilik özellikleri, onların antimikrobiyal etkinliklerini etkileyebilir. Fenolik bileşenlerin zar geçirgenliğini arttırdığı ve iyon sızıntılarına neden olduğu bildirilmiştir [Ma et al., 2021]. Antibakteriyel etki, aynı zamanda metabolizma değişikliği veya zara bağlı enzim inaktivasyonu ile de ilişkili olabilir [Bouarab-Chibane et al., 2019]. Gallik asit gibi fenolik asitler, bakteriyel hücrelerin hidrofobisitesini değiştirebilir ve hücre yüzeyinde gözenekler oluşturarak hücre içi bileşenlerin sızmasına neden olabilir [Zhao et al., 2015]. Ayrıca, kuersetin gibi flavonoidler, DNA giraz enzimini inhibe ederek bakteriyostatik etkiye sahip olabilir [Nguyen and Bhattacharya, 2022]. Ek olarak, sadece fenolikler değil, ekstraktlarda bulunan çeşitli biyoaktif bileşenlerin birlikte çalışarak antimikrobiyal etkilerini ortaya koyabileceği belirtilmiştir [Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009].

Ananas kabuğu ekstraktlarının MİK ve MBK değerleri test bakterilerine karşı değerlendirilmiştir. ACE ekstraktına karşı en hassas olan suşun *S. aureus* ATCC 29213 (MİK: 36.7 mg/mL, MBK: 49.8 mg/mL), en dayanıklı suşun ise *E. faecalis* ATCC 29212 (MİK: 111.2 mg/mL, MBK: 157.3 mg/mL) olduğu saptanmıştır. ACD

ekstraktına karşı ise en hassas suşun *S. uberis* ATCC 700407 (MİK: 24.9 mg/mL, MBK: 39.6 mg/mL), en dayanıklı suşların ise *S. aureus* ATCC 25923 (MİK: 151.8 mg/mL) ve *E. faecalis* ATCC 29212 (MBK: 197.3 mg/mL) suşlarının olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada dondurularak kurutulmuş ananas kabuklarından metanol ve etanol çözücülerini kullanılarak elde edilen ekstraktlar *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi bakterilere karşı MİK ve MBK değerlerini belirlemek üzere test edilmiştir. Bu çalışma sonunda metanol ekstraktı ile 0.62-20 mg/g MİK ve MBK değerleri, etanol ekstraktı ile 1.25-40 mg/g MBK değerleri belirlendiği rapor edilmiştir [Jatav et al., 2022]. Yaş ananas kabuğundan etanol kullanılarak elde edilen ekstrakt ile gerçekleştirilen bir çalışmada, metisiline dayanıklı *S. aureus* suşlarına karşı ekstraktın etkinliği incelendiğinde MİK değerinin %50 ekstrakt uygulaması ile, MBK değerinin ise %100 ekstrakt uygulaması ile elde edildiği bildirilmiştir (Çizelge 5.6) [Husniah and Tri Umiana Soleha, 2023].

Çizelge 5.6: Ananas kabuğu ekstraktları ile elde edilen en yüksek ve en düşük antimikrobiyal etki sonuçları (SU: *S. uberis* ATCC 700407, BS: *B. subtilis* ATCC 6633, BC: *B. cereus* ATCC 11778, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, SA25923: *S. aureus* ATCC 25923, SA29213: *S. aureus* ATCC 29213, EA: *E. aerogenes* ATCC 13048).

		Ekstraktlar	
Antimikrobiyal Etki		ACE	ACD
İnhibisyon zon çapı (mm)	En yüksek	13 (BC)	12 (BC)
	En düşük	10 (EF, SA25923, SU ve BS)	7 (EA ve PA)
MİK (mg/mL)	En yüksek	36.7 (SA29213)	24.9 (SU)
	En düşük	111.2 (EF)	151.8 SA25923)
MBK (mg/mL)	En yüksek	49.8 (SA29213)	39.6 (SU)
	En düşük	157.3 (EF)	197.3 (EF)

Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının bakteri büyümelerine zamana bağlı etkileri incelendiğinde, yapılan diğer antimikrobiyal etki belirleme testleri ile paralel olarak bakterisidal etkiye sahip oldukları doğrulanmıştır. MİK değerlerine göre karar verilen

kullanılan konsantrasyonu belirlenen PVE ve PVD ekstraktları, 1/8 (s/s) oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Bu çalışma sonunda PVE ve PVD ekstraktlarının bakteri hücre sayılarında 90 dakika içerisinde yaklaşık 6 log düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Agar kuyu difüzyonu ve MİK/MBK değeri belirleme çalışmaları sonunda PVE ekstraktına karşı en hassas bakterinin *S. uberis* ATCC 700407 olduğu belirlense de PVD ekstraktına maruz kalmaya karşı ilk 45 dakika direnç gösterebildiğini ortaya koymuştur. PVE ekstraktı, tüm test edilen bakteriler için bakterisidal etkiyi daha kısa zamanda göstermiştir. Bu durum, Elhadeb et al. (2021) tarafından gerçekleştirilen önceki bir çalışma ile uyumludur; fıstık dış kabuğu su ekstraktı Gram-pozitif *L. monocytogenes* bakterisinin hücre sayılarını 3 saat içinde hızlı ve önemli ölçüde azalttığını rapor etmiştir.

Ananas kabuğu ekstraktlarının test bakterilerinde zamana bağlı büyüme özelliklerine etkileri incelendiğinde ACE ve ACD ekstraktlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. ACD ekstraktının neredeyse tüm bakterilerde (*S. aureus* ATCC 29213 ve *B. cereus* ATCC 11778 hariç) ACE ekstraktından daha kısa sürede öldürücü etki gösterdiği görülmüştür. Ananas kabuğu ekstraktlarına karşı en hassas olan suşların *S. aureus* ATCC 29213, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarının olduğu saptanmıştır.

5.1.4. Antibiyofilm etki

Doğal antibiyofilm ajanların en çok ihtiyaç duyulacağı alanların başında gıda işlemede kullanılan yüzeyler gelmektedir. Gıda işleme esnasında oluşan biyofilmin ortadan kaldırılmasında (klor, perasetik asit vb.) veya biyofilm oluşumunu önlemede kullanılan sentetik ajanlar ile ilgili en büyük problemin, bu ajanların kalıntı bırakmasıdır. Bu nedenle doğal antibiyofilm etkili ajanların araştırılması ve potansiyellerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu tez çalışmasında fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının biyofilm önleyici ve biyofilmi ortadan kaldırıcı etkileri incelenmiştir. *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Bacillus* gibi çeşitli patojenlerde biyofilm oluşumu, bir virülans göstergesidir. Biyofilm oluşumunun önlenmesi, antibiyofilm ajanlarının bakterisidal aktivitesi ile ilişkilidir. Bitki türevli bileşikler antimikrobiyal ile antibiyofilm aktiviteleri nedeniyle [Del Pozo, 2018], bakteriyel büyümeyi veya çeşitli yüzeylere tutunmayı engelleyerek mikrobiyal kontrolü sağlayabilmektedir [Tariq et al., 2019] *P.*

vera kabuğunun antimikrobiyal aktivitesi ve fitokimyasal içeriği üzerine yoğun araştırmalar var olmasına rağmen, biyofilm tabakası oluşumu, QS veya hareketlilik gibi biyofilmle ilişkili özelliklere odaklanan sınırlı araştırma bulunmaktadır. Bu amaçla, bu çalışmada bazı biyofilm oluşturan bakterilerin biyofilmleri üzerine PVE ve PVD ekstraktlarının etkinliği incelenmiştir. Test bakterileri tarafından oluşturulan biyofilm oluşumunun yoğunluğu 0.41 ile 1.56 OD₅₇₅ arasında değişmektedir. Bunlar arasında, *S. aureus* ATCC 25923 en yüksek biyofilm üretimini (1.56 OD₅₇₅) sergilerken, *E. aerogenes* ATCC 13048 en düşük biyofilm üretimini (0.41 OD₅₇₅) sağladığı belirlenmiştir (Çizelge 5.7).

Biyofilm önleme etkinlikleri incelendiğinde ACE ve ACD ekstraktının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde farklı seviyelerde etkili olduğu görülmüştür. En yüksek biyofilm önleyici etkinin ACE ve ACD ekstraktları ile *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun biyofilmini sırasıyla %95 ve %96 oranlarında önleyerek sağlandığı saptanmıştır. En düşük biyofilm önleyici etkinin ise ACE için *S. uberis* ATCC 700407 (%27) ve ACD için ise *E. aerogenes* ATCC 13048 (%77) suşuna karşı olduğu belirlenmiştir. Literatürde ananas kabuğu veya diğer kısımları ile çalışılmış çok fazla sayıda biyofilm çalışması bulunmamaktadır. Ananas meyvesinin su ekstraktı ile gerçekleştirilen biyofilm önleme çalışmasında Gram negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilmini önlemek amaçlanmış ve ekstraktın biyofilm oluşumunu %90.4 oranında inhibe ettiği saptanmıştır [Musthafa et al., 2010]. Geniş bakteri türü çeşitliğini nedeni ile mevcut çalışma ile literatüre ananas kabuğu ekstraktları ile biyofilm önleme anlamında önemli katkılar sağlanmıştır (Çizelge 5.8).

Bitki ekstraktlarının biyofilm kaldırma aktiviteleri, esas olarak kimyasal özellikleri ile ilişkilidir. Bazı bitki ekstraktları, asidik pH nedeniyle fizikokimyasal özelliklerinden dolayı olgun biyofilm tabakalarını ortadan kaldırabilme kapasitesine sahiptir. PVE ve PVD'nin önleme aktivitelerinin yanı sıra bu test bakterilere karşı biyofilm kaldırma aktiviteleri de test edilmiştir. 48 saatlik biyofilm tabakalarının kaldırılması, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler için sırasıyla %22 ile %89 ve %41 ile %74 arasında değiştiği belirlenmiştir. Özellikle PVE, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteri gruplarına karşı sırasıyla %56 ila %74 ve %30 ile %79 arasında değişen oranlarda biyofilm kaldırma aktivitesi sergilemiştir. İlginç bir şekilde PVD, biyofilm kaldırma aktivitesini (%98 ile %100) sadece Gram-pozitif test bakterilere karşı göstermiştir. Literatürde biyofilm ortadan kaldırma ile ilgili herhangi bir çalışma

olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak, fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının üretilen biyofilm tabakalarını ortadan kaldırma konusunda etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.7).

Ananas kabuğu ekstraktları ACE ve ACD ile biyofilm ortadan kaldırma çalışmaları gerçekleştirilmiş fakat bu ekstraktların biyofilm ortadan kaldırıcı etkiye sahip olmadıkları görülmüştür (Çizelge 5.8). Literatürde bu konuda bulunan bir adet çalışma mevcuttur. İlgili çalışmada *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* ve *T. denticola* bakterilerinin biyofilmlerini ortadan kaldırmada ananas kabuğu etanol ekstraktı kullanılmış ve ekstraktın %25-100 oranları arasında ortadan kaldırma etkisine sahip olduğu rapor edilmiştir [Gani Souliisa et al., 2021].

Çizelge 5.7: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının en yüksek ve en düşük antibiyofilm etkileri (%) (SU: *S. uberis* ATCC 700407, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, EA: *E. aerogenes* ATCC 13048, EC: *E. coli* ATCC 25922, PA: *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Antibiyofilm Etki (%)	Ekstraktlar		
		PVE	PVD
Önleme	En yüksek	100 (EF ve SU)	100 (EF ve SU)
	En düşük	0 (EC, EA ve PA)	0 (EC, EA ve PA)
Ortadan Kaldırma	En yüksek	74 (PA ve EF)	100 (EF ve SU)
	En düşük	30 (EC)	0 (PA, EC ve EA)

Çizelge 5.8: Ananas kabuğu ekstraktlarının antibiyofilm etkileri (%) (SU: *S. uberis* ATCC 700407, EF: *E. faecalis* ATCC 29212, EA: *E. aerogenes* ATCC 13048).

Antibiyofilm Etki (%)	Ekstraktlar		
		ACE	ACD
Önleme	En yüksek	95 (EF)	96 (EF)
	En düşük	27 (SU)	77 (EA)
Ortadan Kaldırma	En yüksek	etki yok	etki yok
	En düşük	etki yok	etki yok

5.1.5. Antiquorum sensing etki

Bakteriyel haberleşmenin temeli olan QS mekanizması, alternatif bakteriyel kontrol için hedef mekanizmalardan biridir. Bakteriyel yükü kontrol ederken antibiyotik direncini arttırmamanın yollarından biri antipatojenik etkinliktir. Antipatojenik etkinliği sağlamanın yollarından biri anti-QS etkinliğe sahip ajanlar kullanmaktır. Bu amaçla kullanılan furanlı bileşikler yüksek toksisiteleri nedeni ile endişeye sebep olmaktadır [Huber et al., 2003; Luís et al., 2014; Chen et al., 2020]. Bitki ekstraktlarında bulunan biyoaktif bileşenler, QS'nin düzenleyici sistemlerine müdahale ederek mikrobiyal virülansı veya patojeniteyi hafifletme potansiyeline sahiptir [Pilar Truchado et al., 2015]. Bu nedenle temiz içerikli alternatiflerin araştırılması ve potansiyellerinin belirlenmesi önemli olmaktadır. Bitkisel materyallerden elde edilen ekstraktların etki ettiği birçok biyotik mekanizmanın belirlenmesi kadar QS mekanizmalarına etkisini belirlemek de bu amaca ulaşmayı sağlayacaktır. Fitokimyasalların anti-QS etkileri, dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olan seleksiyon baskısını içerdiği çeşitli bileşikler sayesinde azaltarak mikroorganizmaların patojenitesini azaltma yönünde bir etki yapabilir [Clatworthy et al., 2007]. Bu amaçla bu tez çalışmasında QS çalışmaları için model mikroorganizma olan *C. violaceum* bakterisinin yabanıl tip ve mutant suşları kullanılarak fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının anti-QS etkinlikleri incelenmiştir.

Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının viyolasein üretimi üzerindeki inhibe edici aktivitesini değerlendirmek için PVE ve PVD ekstraktları yabanıl tip *C. violaceum* ATCC 12472 suşuna karşı kuyu difüzyon tekniği kullanılarak test edilmiştir. PVE ve PVD ekstraktlarının oluşturduğu inhibisyon zon çaplarının sırasıyla 18 mm ve 16 mm olduğu belirlenmiştir. Bu durum ile, viyolasein inhibisyonunda PVE ekstraktının PVD ekstraktına göre daha yüksek etki sergilediği görülmüştür.

Köklerin, yaprakların ve tohumların metanol ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada; bu ekstraktları içeren kitosan filmlerin *C. violaceum* CV026 suşuna karşı anti-QS etkileri incelenmiştir. Anti-QS, disk difüzyon (inhibisyon zon çapı: 8.11-29.38 mm) ve kantitatif testler (viyolasein inhibisyonu: 28.13 ve 89.34%) aracılığıyla değerlendirildi [Kaya et al., 2018]. Referans çalışmalarla karşılaştırıldığında, PVE ve PVD ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif değerlendirmelere dayanarak etkili anti-QS ajanları olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.9).

Ananas kabuğu ekstraktlarının viyolasein üretimi üzerindeki inhibe edici aktivitesini değerlendirmek için ACE ve ACD ekstraktları yabancıl tip *C. violaceum* ATCC 12472 suşuna karşı kuyu difüzyon tekniği kullanılarak test edilmiştir. ACE ve ACD ekstraktlarının oluşturduğu inhibisyon zon çaplarının sırasıyla 14 mm ve 15 mm olduğu belirlenmiştir. Bu durum ile, viyolasein inhibisyonunda ananas kabuğu ekstraktları arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Literatürde ananas kabuğu ekstraktı ile anti-QS ilişkili çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bulunan bir adet çalışmada, ananas meyvesi etanol ekstraktı *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasein üretimine etkisi incelenmiş ve inhibisyon zon çapı oluşumu gözlemlendiği belirtilmiştir [Musthafa et al., 2010].

PVE ve PVD ekstraktlarının *C. violaceum* CV026 suşunda HSL indüklü viyolasein üretimine ve suşun büyümesine birlikte etkisi incelendiğinde, yüksek ekstrakt konsantrasyonlarına maruz kalan *C. violaceum* CV026 hücrelerinin öldüğü ve dolayısı ile viyolasein üretiminin de inhibe olduğu görülmüştür. Fakat anti-QS ilişkili antipatojenik etkinliğin de hedeflendiği bu çalışma ile, bakteri büyümesine inhibe edici etkinin az olduğu fakat viyolasein inhibisyonun yüksek olduğu konsantrasyonların belirlenmesi önem arz etmektedir. Daha seyreltik ekstrakt kullanılan uygulamalardan 1/128 (s/s) konsantrasyonunda, PVE ve PVD ekstraktlarının viyolasein inhibisyonunu sırasıyla %63 ve %55 oranlarındayken, hücre büyümesi inhibisyonunun yalnızca %35 ve %37 olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.9). Böylece fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının bakteride direnç geliştirmeden virulansını kontrol altına almada (antipatojenite) etkin materyaller olduğu ortaya konulmuştur. Anacardiaceae familyasının bir üyesi olan mango bitkisinin yaprakları kullanılarak yapılan bir çalışmada petrol eteri ile ekstraksiyonun ardından farklı çözücüler ile elde edilen fraksiyonlar *C. violaceum* CV026 suşunda viyolasein üretimine etkisi incelenmek üzere kullanılmıştır. İlgili çalışma sonunda en yüksek viyolasein inhibisyonunun metanol fraksiyonu ile %83.6 oranında elde edildiği belirtilmiştir [Husain et al., 2017].

Çizelge 5.9: Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının kalitatif (mm) ve kantitatif (%) anti-QS etkileri.

Anti-QS Etki		Ekstraktlar	
		PVE	PVD
Kalitatif (mm)	İnhibisyon zon çapı	18	16
Kantitatif (%)	Viyolasein inhibisyonu	63	55
	Büyüme inhibisyonu	35	37

ACE ve ACD ekstraktlarının *C. violaceum* CV026 suşunda HSL indüklü viyolasein üretimine ve suşun büyümesine birlikte etkisi incelendiğinde, yüksek ekstrakt konsantrasyonlarına maruz kalan *C. violaceum* CV026 hücrelerinin fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarındakine benzer şekilde öldüğü ve dolayısı ile viyolasein üretiminin de inhibe olduğu görülmüştür. Fakat anti-QS ilişkili antipatojenik etkinliğin de hedeflendiği bu çalışma ile, bakteri büyümesine inhibe edici etkinin az olduğu fakat viyolasein inhibisyonun yüksek olduğu konsantrasyonların belirlenmesi önem arz etmektedir. Daha seyreltik ekstrakt kullanılan uygulamalardan 1/128 (s/s) konsantrasyonunda, ACE ve ACD ekstraktlarının viyolasein inhibisyonunu sırasıyla %85 ve %69 oranlarındayken, hücre büyümesi inhibisyonunun yalnızca %17 ve %19 olduğu saptanmıştır. Böylece ananas kabuğu ekstraktlarının bakteride direnç geliştirmeden virulansını kontrol altına almada (antipatojenite) etkin materyaller olduğu ortaya konulmuştur. Ananas kabuğu ekstraktı ile anti-QS ilişkili çalışmaların sayısı literatürde yetersizdir. Bulunan bir adet çalışmada, ananas meyvesi etanol ekstraktı *C. violaceum* CV026 suşunda viyolasein üretimine etkisi incelenmiş ve viyolasein üretiminin %89 oranında inhibe edildiği belirlenmiştir (Çizelge 5.12) [Musthafa et al., 2010].

Çizelge 5.12: Ananas kabuğu ekstraktlarının kalitatif (mm) ve kantitatif (%) anti-QS etkileri.

Anti-QS Etki		Ekstraktlar	
		ACE	ACD
Kalitatif (mm)	İnhibisyon zon çapı	14	15
	Viyolasein inhibisyonu	85	69
Kantitatif (%)	Büyüme inhibisyonu	17	19

5.1.6. Piyosiyanin inhibisyonu

P. aeruginosa PAO1, biyofilm çalışmalarında sıkça kullanılan bir model mikroorganizmadır. Bu mikroorganizmanın biyofilm için uygun koşullar oluştuğunda piyosiyanin olarak adlandırılan yeşil renkli bir pigment üretir. Bu pigmentin varlığı ve miktarının artması bakterinin biyofilm oluşturmadaki etkinliği ile ilişkilendirilir. Bu tez çalışmasında fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının biyofilm ilişkili bir mekanizma olan piyosiyanin üretimine etkisi incelenmiştir.

Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktlarının piyosiyanin üretimine etkisi PVE ve PVD ekstraktları varlığında incelenmiş ve sırasıyla %61 ve %75 oranında inhibisyona neden oldukları saptanmıştır. Tahrioui et al. (2020), *P. lentiscus* meyvelerinden farklı çözücüler (siklohegzan, etil asetat, metanol, su) kullanarak elde ettiği ekstraktlar ile piyosiyanin üretimini %82'ye varan oranlarda (siklohegzan) inhibe edebildiğini rapor etmiştir. *Pistacio* cinsi üyeleri ile bu konuda fazla sayıda çalışma bulunmadığından sonuçlar *Anacardiaceae* familyası üyeleri ile karşılaştırılmıştır. *Rhus coriaria* (sumak, *Anacardiaceae* üyesi) meyve ekstraktı ile gerçekleştirilen bir çalışmada, farklı organik çözücüler (n-hegzan (S1), kloroform (S2), etil asetat (S3), n-bütanol (S4), etanol (S5), su (S6)) kullanılarak elde edilen ekstraktların virülansla ilişkili özellikleri araştırılmıştır. 25 *P. aeruginosa* izolatında test edilen ekstraktlar, su ekstraktının (S6) sürüş (85%) ve yüzme (%76) yetenekleri üzerinde en yüksek inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir [Ahmed et al., 2022]. *Mangifera indica* L. (Mango, *Anacardiaceae* üyesi) yaprakları kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada, ekstraksiyon petrol eteri ile gerçekleştirilmiş, ardından farklı çözücüler (benzen, etil asetat, aseton, metanol ve etanol) fraksiyonlama için kullanılmıştır. Ekstraktların

biyofilm ile ilişkili virölans özellikleri incelenmiştir. Metanol fraksiyonu, *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı süzülme ve biyofilm inhibisyonunda sırasıyla %74.6 ve %72.4 oranlarında en yüksek etkiyi göstermiştir. Ayrıca, ekstraktların anti-QS aktivitesini değerlendirmek için *C. violaceum* CV026 suşundaki viyolasein üretimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve metanol fraksiyonunun viyolasein inhibisyonunda %83.6 oranında bir inhibisyon sergilediği gözlemlenmiştir [Husain et al., 2017].

Ananas kabuğu ekstraktlarının piyosiyanın üretimine etkisi ACE ve ACD ekstraktları varlığında incelenmiş ve sırasıyla %94 ve %98 oranında inhibisyona neden oldukları saptanmıştır. Musthafa et al. (2010) çalışmasında, ananas meyvesi etanol ekstraktı *P. aeruginosa* PAO1 suşunda piyosiyanın üretimine etkisi incelenmiş ve piyosiyanın üretiminin %88 oranında inhibe edildiği belirlenmiştir [Musthafa et al., 2010].

5.1.7. Bakteriyel hareketlilik

Bakteriyel hareketlilik, bakterilerde önemli bir virölans faktörüdür. Fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının bakteriyel hareketlilik üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, PVE, PVD, ACE ve ACD ekstraktları ile *P. aeruginosa* PAO1'in yüzme ve süzülme hareketliliği 72 saat boyunca ilgili ortamlarda kültüre edilmiş suş üzerinde incelenmiştir.

PVE ekstraktının yüzme ve süzülme hareketini %100 oranında, PVD ekstraktının ise yüzme hareketini %72, süzülme hareketini %65 oranında inhibe ettiği görülmüştür. *Anacardiaceae* familyasından olan sumak bitkisinin meyveleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada su ekstraktı ile *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme hareketi %76 oranında, süzülme hareketi ise %85 oranında inhibe edildiği belirtilmiştir [Ahmed et al., 2022]. Aynı familyadan mango bitkisinin yaprak ekstraktı ile yapılan bir başka çalışmada ise *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yüzme hareketi %89 oranında, süzülme hareketi ise %75 oranında inhibe edildiği belirtilmiştir [Husain et al., 2017]. ACE ve ACD ekstraktları ise yüzme ve süzülme hareketlerini %100 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir.

5.1.8. Hücre zar potansiyeli ve sitoplazmik pH değerine etkileri

Ekstraktlarının antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli değerlendirilirken, fitokimyasal içeriğinin aydınlatılması kadar antimikrobiyal etkinliği sağlarken etki ettiği mekanizmaların aydınlatılması da önemlidir. Fenolik bileşiklerce zengin bitkisel

ekstraktların bakterilere etki ederken genellikle hücre dışı yapıları hedef aldığı bilinmektedir. Bu sayede hücre içine girip içsel bazı mekanizmalara da etki edebilir hale gelmektedirler. Çalışmada kullanılan fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının hedeflediği mekanizmaları belirlemek amacıyla, hücre zar potansiyeline etkisi Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına karşı incelenmiştir.

Bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler hücredeki zar proteinlerine, metabolizmada görevli önemli enzimlere veya zar geçirgenliğine etki ederek, proton hareket gücünde kayba neden olarak mikroorganizmalara zarar verebildikleri rapor edilmiştir [Topuzović et al., 2015]. Mikrobiyal kontrol çalışmalarında sıkça çalışılan hücre zarı seviyesinde gerçekleşen aktiviteler zar geçirgenliğinin geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz zarar görmesine kadar değişmektedir. Her iki tarımsal atığa ait ekstraktların da bakteriyel hücrelerde zar potansiyeline etkileri herhangi bir araştırmacı tarafından değerlendirilmemiştir. Hücre zarının potansiyeli, herhangi bir biyoaktif ajana maruz kalma nedeniyle hiperpolarizasyon veya depolarizasyon yönünde değiştiğinde, ilgili biyoaktif ajanın hücre zarına etti ettiği söylenebilir. Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşlarında PVE ve PVD ekstraktlarının zar potansiyeline etkisi incelendiğinde, bu ekstraktların test bakterilerinin zar potansiyelini depolarizasyon yönünde değiştirdiği görülmüştür. ACE ve ACD ekstraktlarının Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşlarında zar potansiyeline etkisi incelendiğinde, bu ekstraktların da test bakterilerinde zar potansiyelini depolarizasyon yönünde değiştirdiği belirlenmiştir. Depolarizasyonun her zaman hücre ölümü ile sonuçlanmadığı bilinse de önemli hücresel işlevleri önemli derecede etkilediği ortaya konulmuştur [Yap et al., 2021]. Bu çalışma ile fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktı uygulamalarından kaynaklı antimikrobiyal etkiyi sağlayan mekanizmalardan birinin ekstraktların hücre zarı hedefli çalışabilmesi olduğu ortaya konulmuştur.

Sitopazmik pH değerinin (pH_{int}) bozulmaması metabolik aktivitelerin devamlılığı için önemlidir. Bu tez çalışması ile, bakteri hücrelerine farklı mekanizmalar ile etki ettiği belirlenen fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının pH_{int} değerine etkisi Gram negatif *E. coli* ATCC 25922 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 suşları üzerinde değerlendirilmiştir. Fıstık dış pembe kabuğu ekstraktları

incelendiğinde *E. coli* ATCC 25922 suşunun pH_{int} değerini düşürmede PVD ekstraktının PVE ekstraktından daha etkili olduğu görülmüştür. *E. coli* ATCC 25922 suşuna gentamisin uygulanması sonucunda pH_{int} değerinde bir değişiklik olmazken, gentamisinin bu suşa karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu agar kuyu difüzyonu çalışması ile belirlenmiştir. Bu durum gentamisin aracılı antimikrobiyal etkinlikte pH_{int} değişimi kaynaklı olmadığını göstermektedir. *S. aureus* ATCC 25923 suşunda pH_{int} değerini düşürmede ise PVE ekstraktı, PVD ekstraktından daha etkili olduğu bulunmuştur. Ananas kabuğu ekstraktları değerlendirildiğinde *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarının pH_{int} değerini düşürmede ACE ekstraktının ACD ekstraktından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuçta, hücre içini daha asidik bir hale getirerek metabolik aktiviteyi etkilemeleri ile antimikrobiyal etkinliği sağladıkları çıkarılabilir.

5.1.9. Nanopartikül sentezinde PVE ekstraktının kullanımı ve antimikrobiyal etkinliği

Nanopartikül sentezi esnasında kimyasal yöntemlerin kullanımı çevre kirliliğine yol açabilen çeşitli kimyasal atıkların yüksek miktarda açığa çıkarılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle “yeşil sentez” olarak adlandırılan, nanopartikül sentezinde mikroorganizmalar veya bitkisel ekstraktlar gibi biyolojik materyallerin kullanımını içeren alternatif sentez yöntemleri ilgi çekmektedir. Bu amaçla bu çalışmada PVE ekstraktının indirgeyici özelliğini bakır nanopartikül sentezinde etkinliği incelenmiş ve elde edilen nanopartiküllerin (PVE-NP) *E. coli* ATCC 29212 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarının büyümesini inhibe edici özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, indirgeyici ajan olarak sodyum borhidrürün kullanıldığı sentez ile elde edilen bakır nanopartiküller (CuSB-NP) ile karşılaştırılmıştır. Taghizadeh ve Rad-Moghadam (2018)’in çalışmasında, organik boyaların indirgenmesinde katalizör olarak kullanmak üzere fıstık dış kabuğu-Cu nanokompoziti üretilmiş ve sonuçta yuvarlak şekilli bakır nanopartiküllerin elde edilebildiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında ise PVE-NP sentezi sonucunda, elde edilen nanopartiküllerin amorf yapıda olduğu SEM, EDS ve XRD analizleri sonucu belirlenmiştir. Taghizadeh ve Rad-Moghadam (2018), sonikasyon aracılı ekstraksiyon (60°) gerçekleştirirken, bu çalışmada mikrodalga aracılı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon yöntemleri arasında fark olması ekstraktların içeriklerini ve böylece indirgeyici özelliklerini etkileyebileceğinden, elde edilen nanopartiküllerin yapısında farklılık

görülebılır. XRD analizi sonucunda karakteristik difraksiyon piklerinin net olarak ayrırt edilemediği görülmüştür, bu da yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen PVE-NP'lerin amorf yapıda olduğunu göstermektedir (Seth et al., 2022). *Chelianthes bicolor* (Seth et al., 2022), ökaliptus (Wang et al., 2014) ve yeşil çay (Weng et al., 2013) ekstraktları ile gerçekleştirilen çalışmalarda da $2\theta = 20^\circ$ civarında, ekstraktlardan kaynaklı organik materyallerin nanopartiküllerin yüzeyine yapışması ile geniş bir pik oluşumu görülmüştür. Seth et al. (2022)'nın çalışmasına benzer şekilde kimyasal yöntemle sentezlenen CuSB-NP'ler içerisinde metalik bakır (2θ 'da 29.9° , 43.4° , 50.5° , ve 73.8°) ve CuO (36.7° , 42.6° , ve 61.7°) bulunduğu belirlenmiştir. Bu durum nanopartiküllerin büyüklüğünü spesifik olarak belirlemeyi zorlaştırsa da PVE-NP'lerin boyutunun 24-35 nm, CuSB-NP'lerin ise 17-24 nm arasında olduğu SEM görüntülerine dayanılarak belirlenmiştir.

Antimikrobiyal etkinlikleri açısından incelendiğinde ise PVE-NP'lerin etkin olduğu söylenebilir. PVE-NP'lerin *E. coli* ATCC 25922 suşunda (%76 inhibisyon), *S. aureus* ATCC 25923 suşuna kıyasla (%49 inhibisyon) daha yüksek inhibe edici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna paralel şekilde CuSB-NP'ler de *E. coli* ATCC 25922 suşunda %84 oranında, *S. aureus* ATCC 25923 suşunda ise %77 oranında büyüme inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür. Bakır nanopartiküllerin hücreler arasındaki aminoasitlerle bağlanarak proteinlerin denatürasyonuna neden oldukları rapor edilmiştir (Tong et al., 2005). Ayrıca zar proteinlerini destabilize ederek zar potansiyelini ve dolayısı ile hücre içi ATP seviyesini etkilediği bilinmektedir (Lok et al., 2006). Raffi et al (2009) *E. coli* bakterisine bakır nanopartiküllerin 20 ve 40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulanması sonucu bakteriyel büyümeyi yaklaşık 10 log seviyesinden 6 ve 4 log seviyesine indirdiği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan PVE ekstraktının *S. aureus* ATCC 25923 suşunda %100 inhibisyona neden olduğu, *E. coli* ATCC 25922 suşunda inhibisyona neden olmadığı görülmüştür. Bakteriyel üreme inhibisyon oranları karşılaştırıldığında, Gram negatif bakterilere etki etmediği belirlenen PVE yerine, PVE aracılı sentezlenen bakır nanopartiküllerin kullanımı önerilebilir.

5.2. Sonuç ve öneriler

Bu tez çalışmasında kullanılan tarımsal atıklar olan fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu, biyoaktif ekstraktlar elde etmek amacıyla çalışılmıştır. Ekstraksiyon çözeltisi

olarak etanol (fıstık kabuğu için %60 (s/s), ananas için %80 (s/s)) ve saf su kullanılmıştır. Ekstraktların fitokimyasal içerikleri aydınlatılmış ve biyoaktiviteleri çeşitli testler yardımıyla belirlenmiştir. Biyoaktivite çalışmaları kapsamında; antimikrobiyal, antibiyofilm, antiquorum sensing etkileri, bakterilerde virulansın şiddetini belirleyen *P. aeruginosa* PAO1 suşunda yüzme ve süzülme hareketi ile piyosiyanin üretimine etkileri ve son olarak da hücresel düzeyde etkilerini değerlendirmek amacıyla hücre zar potansiyeli ve sitoplazmik pH değeri üzerine etkileri araştırılmıştır.

- PVE, PVD, ACE ve ACD ekstraktlarının fitokimyasal içerik açısından zengin, biyoaktivite açısından geniş spektrumlu ve çeşitli bakterilerde birçok farklı mekanizmaya etki ederek antimikrobiyal ve antibiyofilm etki potansiyellerine sahip oldukları ortaya konulmuştur.

- Her iki materyalin etanol ve su ekstraktları kendi içlerinde değerlendirildiğinde genel olarak etanol kullanılarak hazırlanan ekstraktların daha zengin fitokimyasal içeriğe ve etkin biyoaktivite özelliklerine sahip olduğu görülmüştür. Böylece, etanol aracılı ekstraksiyon gerçekleştirmenin, bitkisel dokular içerisindeki fitokimyasal bileşiklerin çözelti ortamına transferini kolaylaştırdığı ortaya konulmuştur. Mikrobiyoloji alanında gerçekleştirilen bu tez çalışması ile, ilgili ekstraktların birçok alanda sorun teşkil eden önemli patojen bakterilere karşı yüksek ve çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. İlgili tarımsal atıklar ile yapıldığı rapor edilen diğer çalışmalardan ve bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar kıyaslandığında benzer ve farklı sonuçların elde edildiği birçok test mevcuttur. Bu farklılıkların:

- Kullanılan meyvenin çeşidi, yetiştiği bölge ve hasat zamanının farklı olmasından,
- Ekstraksiyon çözeltisi türünden,
- Ekstraksiyonda bitkisel materyalin yaş veya kuru kullanılmasından,
- Bitkisel materyali kurutmada tercih edilen farklı uygulamalardan (oda sıcaklığı, ısı aracılı, dondurarak kurutma),
- Ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla uygulanan ön işlemlerden (ultrasonik ses dalgası, mikrodalga uygulaması, çalkalama, sıcak veya soğukta inkübasyon),

- Ekstrakt içerisindeki çözücünün uzaklaştırılmasında kullanılan farklı yöntemlerden,
- Bakterilerin suşlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gelecek çalışmalarda:

- Ekstraktların çeşitli bakteriler için etki mekanizmaları moleküler düzeyde incelenebilir. Antimikrobiyal, antibiyofilm, anti-QS vb. aktivitelerin sağlanmasında ekstraktların hedeflediği genlerin belirlenmesi önemlidir. Kantitatif yapı-aktivite ilişkisi analizi (*Quantitative structure-activity relationships* (QSAR)) gibi modeller ile ekstrakt içerisindeki biyoaktif bileşiklerin aktivitesinin hücre içi bağlantısı veya moleküler kenetleme (*molecular docking*) çalışmaları ile ekstrakt ve ilgili bir protein veya enzimin etkileşimini araştırmak ile ekstraktların kullanım potansiyeli incelenebilir.
- Bu tez çalışmasında antibiyofilm etkinlik polistiren yüzey üzerinde değerlendirilmiştir. Fakat biyofilmlerin sağlık, gıda ve kozmetik alanlarında sorun olduğu polipropilen, paslanmaz çelik, teflon, polivinilklorür, cam gibi yüzeylerde de ekstraktların antibiyofilm etkileri araştırılmalıdır.
- Enfeksiyon hastalıklarının kontrolünde kullanılan mevcut ajanların yerine veya onların etkisini arttırmak amacıyla, ekstraktların etkinlikleri ileri çalışmalar ile daha detaylı belirlenebilir. Ekstraktların antibiyotik ajanlar ile birlikte kullanımı ve bu uygulamanın enfeksiyon hastalıklarına neden olan nosokomial kaynaklı bakterilere karşı test edilmesi önemlidir.
- Gıda endüstrisinde doğal bir gıda katkı maddesi ve gıda koruyucu olarak kullanılması hedeflendiğinde ilgili raf ömrü süresince gıdanın organoleptik özelliklerine etkisini ayrıntılı incelemek gerekecektir. Mikrobiyal üremeyi kontrol etmede bu denli başarılı oldukları belirlenen fıstık dış pembe kabuğu ve ananas kabuğu ekstraktlarının, antioksidan kapasitelerinin yüksek olması ve içerdikleri fitokimyasal bileşikler sayesinde özellikle gıda endüstrisinde dezenfektan, gıda koruyucu, renklendirici, besin değerini arttırıcı ve hatta aroma verici olarak kullanılabileceklerdir.
- Nanopartikül sentezinde PVE ekstraktının nano temelli kullanım potansiyeli olduğu bu tez çalışması ile ortaya koyulmuştur. Elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları için FT-IR, TEM ve TGA gibi analizlerin yapılması önemlidir. Kristal yapıda, yuvarlak şekilli ve daha küçük boyutlu nanopartiküllerin

eldesi için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin ve optimum koşullarının belirlenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

Abbott, T., Kor-Bicakci, G., Islam, M. S., Eskicioglu, C., (2020). "A review on the fate of legacy and alternative antimicrobials and their metabolites during wastewater and sludge treatment." *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (23), 1–52. <https://doi.org/10.3390/ijms21239241>

Abdi Ali, A., Shafiei, M., Shahcheraghi, F., Saboora, A., Ghazanfari, T., (2015). "The Study of Synergistic Effects of n.butanolic *Cyclamen coum* Extract and Ciprofloxacin on inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation." *Biological Journal of Microorganisms*, 3 (12), 25–32.

Abreu, A. C., McBain, A. J., Simões, M., (2012). "Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*," 29 (9), 1007–1021. <https://doi.org/10.1039/c2np20035j>

Adal, K. A., Barry, M., (1996). "Central venous catheter-related infections: A review." *Nutrition*, 12 (3), 208–213. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(96\)91126-0](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(96)91126-0)

Ahmadi, S., Hamed Mosavian, M. T., Heydari, S., (2018). "Response surface methodology for modelling and determination of catechin in pistachio green hull using surfactant-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by UV–Vis spectrophotometry." *Journal of the Iranian Chemical Society*, 15 (11), 2605–2614. <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1449-1>

Ahmed, A. A., Salih, F. A., Yousef, M., (2022). "*Rhus coriaria* extracts inhibit quorum sensing-related virulence and biofilm production in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn wounds." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25 (10), 1349–1356.

Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M., (2007). "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent." *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

Akalin, S. A., (2014). "Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals." *Trends in Food Science and Technology*, 36 (2), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.002>

Akbas, M. Y., Kokumer, T., (2015). "The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments." *International Journal of Food Science and Technology*, 50 (7), 1666–

1672. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12823>

Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., Shahidi, F., (2001). "Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3), 1410–1416. <https://doi.org/10.1021/jf000595h>

Aliyari, P., Kazaj, F. B., Barzegar, M., Gavlighi, H. A., (2020). "Production of functional sausage using pomegranate peel and pistachio green hull extracts as natural preservatives." *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22 (1), 159–172.

Alva, P. P., Suresh, S., MP, G., Premanath, R., (2019). "Evaluation of anti-quorum sensing activity of indigenous dietary plants against *Pseudomonas aeruginosa*." *European Journal of Integrative Medicine*, 30 (June), 100931. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.100931>

Alvarado-Martinez, Z., Bravo, P., Kennedy, N. F., Krishna, M., Hussain, S., Young, A. C., Biswas, D., (2020). "Antimicrobial and antivirulence impacts of phenolics on *Salmonella enterica* serovar typhimurium." *Antibiotics*, 9 (10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100668>

Alvarez, M. V., Moreira, M. R., Ponce, A., (2012). "Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food." *Journal of Food Safety*, 32 (3), 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00390.x>

Ang, L. F., Yam, M. F., Fung, Y. T. T., Kiang, P. K., Darwin, Y., (2014). "HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional Chinese medicines." *Journal of Pharmacopuncture*, 17 (4), 36–49. <https://doi.org/10.3831/kpi.2014.17.035>

Anokwah, D., Asante-Kwatia, E., Mensah, A. Y., Danquah, C. A., Harley, B. K., Amponsah, I. K., Oberer, L., (2021). "Bioactive constituents with antibacterial, resistance modulation, anti-biofilm formation and efflux pump inhibition properties from *Aidia genipiflora* stem bark." *Clinical Phytoscience*, 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00266-4>

Archibald, L. K., Gaynes, R. P., (1997). "Hospital-acquired infections in the United States." The importance of interhospital comparisons. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11 (2), 245–255.

Aref, H. L., Salah, K. B. H., Chaumont, J. P., Fekih, A., Aouni, M., Said, K., (2010). "In vitro antimicrobial activity of four *Ficus carica* latex fractions against resistant

human pathogens (antimicrobial activity of *Ficus carica* latex)." *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23 (1), 53–58.

Arjeh, E., Akhavan, H. R., Barzegar, M., Carbonell-Barrachina, Á. A., (2020). "Bio-active compounds and functional properties of pistachio hull: A review." *Trends in Food Science and Technology*, 97 (December 2019), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.031>

Azzam, A., Elkafas, H., Khaled, H., Ashraf, A., Yousef, M., Elkashef, A. A., (2023). "Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Egypt (2010–2022): a systematic review and meta-analysis." *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 98 (1). <https://doi.org/10.1186/s42506-023-00133-9>

Bagheri, V., Fathalizadeh, J., Ziaadini, M., Bahramabadi, R., Ayoobi, F., Assar, S., Arababadi, M. K., (2019). "In vitro antibacterial properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) rosy hull phenolic extracts. *Pistachio and Health Journal*, 2 (3), 17–29." <https://doi.org/10.22123/phj.2020.228470.1045>

Bakker, E. P., Mangerich, W. E., (1981). "Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport." *Journal of Bacteriology*, 147 (3), 820–826. <https://doi.org/10.1128/jb.147.3.820-826.1981>

Balaban, M., Koc, C., Sar, T., Akbas, M. Y., (2021). "Antibiofilm effects of pomegranate peel extracts against *B. cereus*, *B. subtilis*, and *E. faecalis*." *International Journal of Food Science and Technology*, 56 (10), 4915–4924. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15221>

Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., Mathee, K., (2013). "A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence." *Nucleic Acids Research*, 41 (1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>

Barone, S., Mateu, B., Turco, L., Pelliccia, S., Lembo, F., Summa, V., ... Brindisi, M., (2024). "Unveiling the modulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation by selective histone deacetylase 6 inhibitors." *Frontiers in Microbiology*, 15, 1340585.

Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., Bellocco, E., (2016). "Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls." *Food Chemistry*, 196, 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.077>

Bayer, A. S., Speert, D. P., Park, S., Tu, J., Witt, M., Nast, C. C., Norman, D. C.,

(1991). "Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*." *Infection and Immunity*, 59 (1), 302–308. <https://doi.org/10.1128/iai.59.1.302-308.1991>

Ben Akacha, B., Michalak, M., Najar, B., Venturi, F., Taglieri, I., Kačániová, M., Ben Saad, R., Mnif, W., Garzoli, S., Ben Hsouna, A., (2023). "Recent advances in the incorporation of polysaccharides with antioxidant and antibacterial functions to preserve the quality and shelf life of meat products." *Foods*, 12 (8), 1647. <https://doi.org/10.3390/foods12081647>

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., Del Río, J. A., (1997). "Uses and properties of citrus flavonoids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (12). <https://doi.org/10.1021/jf970373s>

Bensid, A., Bendeddouche, B., Toy, N., Sigirci, F., Ozogul, F., (2014). "Effects of ice containing three ethanolic plant extracts on formation and accumulation of biofilm communities on fish contact surfaces." *Indian J. Fish.*, 61 (3), 129–134.

Bernal, P., Zloh, M., Taylor, P. W., (2009). "Disruption of D-alanyl esterification of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid by the β -lactam resistance modifier (-)-epicatechin gallate." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (6), 1156–1162. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp094>

Berry, B. J., Trewin, A. J., Amitrano, A. M., Kim, M., Wojtovich, A. P., (2018). "Use the protonmotive force: mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species." *Journal of Molecular Biology*, 430 (21), 3873–3891. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.03.025>

Beykaya, M., Çağlar, A., (2016). "Bitkisel özütler kullanılarak gümüş-nanopartikül (AgNP) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma." *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16 (3), 631-641.

Bisignano, C., Filocamo, A., Faulks, R. M., Mandalari, G., (2013). "In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols." *FEMS Microbiology Letters*, 341 (1), 62–67. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12091>

Bitwell, C., Indra, S. Sen, Luke, C., Kakoma, M. K., (2023). "A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants." *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>

Bodini, S. F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., Santori, F., (2009). "Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid." *Letters in applied microbiology*, 49 (5), 551-555.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simões, M., (2013). "Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria." *Microbial Drug Resistance*, 19 (4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>

Bose, I., Roy, S., Pandey, V. K., Singh, R., (2023). "A comprehensive review on significance and advancements of antimicrobial agents in biodegradable food packaging." *Antibiotics*, 12 (6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060968>

Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., Bordes, C., (2019). "Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (quantitative structure-activity relationship) models." *Frontiers in Microbiology*, 10 (APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>

Boyd, A., Chakrabarty, A. M., (1995). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide." *Journal of Industrial Microbiology*, 15 (3), 162–168. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(92\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(92)90071-5)

Bräuner, T., Hülser, D. F., Strasser, R. J., (1984). "Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes." *BBA - Biomembranes*, 771 (2), 208–216. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90535-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90535-2)

Bravo, L., (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Bullitt, E., Makowski, L., (1995). "Structural polymorphism of bacterial adhesion pili." *Nature*, 373 (6510), 164-167.

Buttress, J. A., Halte, M., Derk Te Winkel, J., Erhardt, M., Popp, P. F., Strahl, H., (2022). "A guide for membrane potential measurements in Gram-negative bacteria using voltage-sensitive dyes." *BioRxiv*, 2022, 2022–04. <https://doi.org/10.1101/2022.04.30.490130>

Cámara-Almirón, J., Navarro, Y., Díaz-Martínez, L., Magno-Pérez-Bryan, M. C., Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D., (2020). "Dual functionality of the amyloid protein TasA in *Bacillus* physiology and fitness on the phylloplane." *Nature Communications*, 11 (1).

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15758-z>.

Cao, J., De La Fuente-Nunez, C., Ou, R. W., Torres, M. D. T., Pande, S. G., Sinskey, A. J., Lu, T. K., (2018). "Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production." *ACS Synthetic Biology*, 7 (3), 896–902. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00396>

Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J., ... Lau, G. W., (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis." *The American Journal of Pathology*, 175 (6), 2473–2488.

Ceylan, O., Sahin, M. D., Akdamar, G., (2016). "Antioxidant and anti-quorum sensing potential of *Acer monspessulanum* subsp. *monspessulanum* extracts." *Planta Medica*, 1335–1340.

Chana-Thaworn, J., Chanthachum, S., Wittaya, T., (2011). "Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract." *Lwt*, 44 (1), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.020>

Chaurasiya, R. S., Umesh Hebbar, H., (2013). "Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods." *Separation and Purification Technology*, 111, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.029>

Chen, X., Yu, F., Li, Y., Lou, Z., Toure, S. L., Wang, H., (2020). "The inhibitory activity of p-coumaric acid on quorum sensing and its enhancement effect on meat preservation." *CYTA - Journal of Food*, 18 (1), 61–67. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1701558>

Choo, J. H., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., (2006). "Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract." *Letters in Applied Microbiology*, 42 (6), 637–641. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>

Christ, B., Müller, K. H., (1960). "Zur serienmäßigen bestimmung des gehaltes an flavonol-derivaten in drogen." *Archiv Der Pharmazie*, 293 (12), 1033–1042. <https://doi.org/10.1002/ardp.19602931202>

Claessens, H. A., Van Straten, M. A., (2004). "Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1060 (1-2 SPEC. ISS.), 23–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.098>

Clatworthy, A. E., Pierson, E., Hung, D. T., (2007). "Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy." *Nature Chemical Biology*, 3 (9), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>

Coban, H. B., (2020). "Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions." *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43 (4), 569–591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>

Conlon, J. M., Mechkarska, M., (2014). "Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae." *Pharmaceuticals*, 7 (1), 58-77.

Cosa, S., Viljoen, A. M., Chaudhary, S. K., Chen, W., (2016). "Hacking in to the social media network of bacteria: The antiquorum sensing properties of herbs and spices." *Planta Medica*, 82 (S 01), P155.

Costerton, A. J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., (1999). "Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections." *Science*, 284 (5418), 1318–1322.

Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., Gunsalus, R. P., (1990). "Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH and the *fnr* gene product." *Journal of Bacteriology*, 172 (11), 6333–6338. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6333-6338.1990>

Cushing, B. L., Golub, V., O'Connor, C. J., (2004). "Synthesis and magnetic properties of Au-coated amorphous Fe₂₀Ni₈₀ nanoparticles." *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 65 (4), 825-829.

Crestani, M., Barbieri, R. L., Hawerth, F. J., de Carvalho, F. I. F., de Oliveira, A. C., (2010). "From the Americas to the World-origin, domestication and dispersion of pineapple." *Ciencia Rural*, 40 (6), 1473–1483. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782010000600040>

D'Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P. M., Bisignano, G., (2010). "Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." *Phytomedicine*, 17 (5), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.008>

Dabesor, A. P., Asowata-Ayodele, A. M., Umoiette, P., (2017). "Phytochemical compositions and antimicrobial activities of *Ananas comosus* peel (M.) and *Cocos nucifera* kernel (L.) on selected food borne pathogens." *American Journal of Plant Biology*, 2 (2), 73-76.

Dahajipour-Heidarabadi, M., Nozari, S., (2021). "Feasibility study of copper nanoparticle biosynthesis using leaf extract as well as green and red hull of pistachios." *Pistachio and Health Journal*, 4 (3), 41–50. <https://doi.org/10.22123/PHJ.2021.303376.1110>

Darah, I., Lim, S. H., Nithianantham, K., (2013). "Effects of methanol extract of *Wedelia chinensis* osbeck (Asteraceae) leaves against pathogenic bacteria with emphasise on *Bacillus cereus*." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (5), 533–539.

Darakhshandeh-Ghahfarokhi, G., Mohammadi-Sichani, M., Tavakoli, M., (2021). "Chemical composition and antibacterial and anti-biofilm activity of acetone extract of pistacia atlantica leaf, fruit, and gall." *Hormozgan Medical Journal*, 25 (2), 54–59. <https://doi.org/10.34172/hmj.2021.03>

Dawidowicz, A. L., Olszowy, M., (2012). "Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds." *Talanta*, 97, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.036>

Del Pozo, J. L., (2018). "Biofilm-related disease." *Expert review of anti-infective therapy*, 16 (1), 51-65.

de Souza, E. L., Meira, Q. G. S., Barbosa, I. de M., Athayde, A. J. A. A., da Conceição, M. L., de Siqueira, J. P., (2014). "Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers." *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1), 67–75. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100010>

de Vasconcelos, A. T. R., de Almeida, D. F., Hungria, M., Guimarães, C. T., Antônio, R. V., Almeida, F. C., de Almeida, L. G. P., de Almeida, R., Alves-Gomes, J. A., Andrade, E. M., Araripe, J., de Araújo, M. F. F., Astolfi-Filho, S., Azevedo, V., Baptista, A. J., Bataus, L. A. M., Batista, J. da S., Beló, A., van den Berg, C., ... Simpson, A. J. G. (2003). "The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (20), 11660–11665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832124100>

Demiral, I., Atilgan, N. G., Şensöz, S., (2008). "Production of biofuel from soft shell of pistachio (*Pistacia vera* L.)." *Chemical Engineering Communications*, 196 (1-2), 104-115.

Deretic, V., Govan, J. R. W., Konyecsni, W. M., Martin, D. W., (1990). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the muc loci affect

transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli." *Molecular Microbiology*, 4 (2), 189–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00586.x>

Deutscher, J., Francke, C., Postma, P. W., (2006). "How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (4), 939–1031. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00024-06>

Dewi, Y. S. K., Simamora, C. J. K., (2023). "Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) cv. queen peel herbal tea with a variety of drying temperatures: bioactive compounds, antioxidant activity and antimicrobial activity." *Food Research*, 7 (4), 344–351. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.7\(4\).005](https://doi.org/10.26656/fr.2017.7(4).005)

Díaz-Montes, E., (2022). "Polysaccharides: sources, characteristics, properties, and their application in biodegradable films." *Polysaccharides*, 3 (3), 480–501. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3030029>

Dickinson, G. M., Bisno, A. L., (1993). "Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations." *International Journal of Artificial Organs*, 16 (11), 749–754. <https://doi.org/10.1177/039139889301601102>

Domínguez, X. A. (1975). "Las investigaciones fitoquímicas Y." *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 34, 147–166.

Donlan, R. M., (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881–890.

Dossa, D., Fuchs, F., (2017). "ABACAXI: Produção, mercado e preços na CEASA-PR." *Informe Técnico*, 1.

Dowidar, N., Moesgaard, F., Matzen, P., (1991). "Clogging and other complications of endoscopic biliary endoprostheses." *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 26 (11), 1132–1136. <https://doi.org/10.3109/00365529108998604>

Duggirala, S., Rakesh, P., Nankar, R. P., Rajendran, S., Doble, M., (2014). "Phytochemicals as inhibitors of bacterial cell division protein FtsZ: coumarins are promising candidates." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 283–296. doi: 10.1007/s12010-014-1056-2

Duncan, T. V., (2011). "Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors." *Journal of colloid and interface*

science, 363 (1), 1-24.

Durán, N., Justo, G. Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G. R., Nakazato, G., (2016). "Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review." *Biotechnology Advances*, 34 (5), 1030–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>

Dutta, S., Bhattacharyya, D., (2013). "Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of *Ananas comosus* (pineapple) crown leaf." *Journal of Ethnopharmacology*, 150 (2), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.024>

Eastoe, C. J., (2016). "Stable chlorine isotopes in arid non-marine basins: Instances and possible fractionation mechanisms." *Applied Geochemistry*, 74, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.08.015>

EFSA panel. (2016). "Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite." *EFSA Journal*, 14 (4). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2016.4438>

Eijkel, J., (2007). "Chip-based HPLC: The quest for the perfect column." *Lab on a Chip*, 7 (7), 815–817. <https://doi.org/10.1039/b707464f>

Elhadef, K., Akermi, S., Ben Hlima, H., Ennouri, K., Fourati, M., Ben Braïek, O., Mellouli, L., Smaoui, S., (2021). "Tunisian pistachio hull extracts: phytochemical content, antioxidant activity, and foodborne pathogen inhibition." *Journal of Food Quality*, 2021, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2021/9953545>

Ellis, M. J., Tsai, C. N., Johnson, J. W., French, S., Elhenawy, W., Porwollik, S., Andrews-Polymenis, H., McClelland, M., Magolan, J., Coombes, B. K., Brown, E. D., (2019). "A macrophage-based screen identifies antibacterial compounds selective for intracellular *Salmonella typhimurium*." *Nature Communications*, 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08190-x>

Elmanama, A. A., Al-Reefi, M. R., (2017). "Antimicrobial, anti-biofilm, anti-quorum sensing, antifungal and synergistic effects of some medicinal plants extracts." *Journal of Natural and Engineering Studies*, 25 (May), 198–207.

Epps, D. E., Wolfe, M. L., Groppi, V., (1994). "Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (Dibac₄ (3)) in model systems and

cells." *Chemistry and physics of lipids*, 69 (2), 137-150.

Essar, D. W., Eberly, L., Crawford, I. P. (1990). "Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent pseudomonads: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida* trpE and trpGDC." *Journal of bacteriology*, 172 (2), 867-883.

Etame, R. E., Mouokeu, R. S., Pouaha, C. L. C., Kenfack, I. V., Tchientcheu, R., Assam, J. P. A., Poundeu, F. S. M., Tiabou, A. T., Etoa, F. X., Kuiate, J. R., Ngane, R. A. N., (2018). "Effect of fractioning on antibacterial activity of *Enantia chlorantha* oliver (Annonaceae) methanol extract and mode of action." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4831593>

Etebu, E., Arikekpar, I., (2016). "Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives." *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90–101. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.2.535>

Eumkeb, G., Sakdarat, S., Siriwong, S., (2010). "Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime." *Phytomedicine*, 18 (1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.09.003>

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B., (2010). "Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>

Fatariah, Z., Zulkhairuazha, T. Y. T., Rosli, W. I. W., (2014). "Quantitative HPLC analysis of gallic acid in *Benincasa hispida* prepared with different extraction techniques." *Sains Malaysiana*, 43 (8), 1181–1187.

Fattahifar, E., Barzegar, M., Ahmadi Gavlighi, H., Sahari, M. A., (2018). "Evaluation of the inhibitory effect of pistachio (*Pistacia vera* L.) green hull aqueous extract on mushroom tyrosinase activity and its application as a button mushroom postharvest anti-browning agent." *Postharvest Biology and Technology*, 145 (May), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.07.005>

FAOSTAT, (2021). "2018 yılı dünya fıstık üretim miktarı." *Food and Agricultural Organization*.

FAOSTAT, (2021). "2015-2018 yılları arası Türkiye fıstık ithalat ve ihracat miktarları ve tutarları." *Food and Agricultural Organization*.

FAOSTAT, (2023). "2019-2021 yılları arası Türkiye ananas ithalatı miktarı." *Food and Agricultural Organization*.

Faure, A. M., Werder, J., Nyström, L., (2013). "Reactive oxygen species responsible for beta-glucan degradation." *Food Chemistry*, 141 (1), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.096>

Fei, P., Xu, Y., Zhao, S., Gong, S., Guo, L., (2019). "Olive oil polyphenol extract inhibits vegetative cells of *Bacillus cereus* isolated from raw milk." *Journal of Dairy Science*, 102 (5), 3894–3902. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15184>

Ferdes, M., (2018). "Antimicrobial compounds from plants." *Fighting Antimicrobial Resistance*, IAPC-OBP, Zagreb, 243–271. <https://doi.org/10.5599/obp.15.15>

Firdouse, S., Alam, P., (2011). "Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers." *International Journal of Phytomedicine*, 3 (1), 32–35.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S., (2016). "Biofilms: An emergent form of bacterial life." *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Folin, O., Ciocalteu, V., (1927). "On tyrosine and tryptophane in proteins." *Journal of Biological Chemistry*, 73 (2), 627–648.

Folin, O., Denis, W., (1912). "On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents." *Journal of Biological Chemistry*, 12 (2), 239–243. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)88697-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)88697-5)

Ford, B. L., Bai, J., Manthey, J., Baldwin, E., (2010). "Improved removal of ascorbate interference in the Folin- Ciocalteu assay of "Total phenolic content". " *In Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 123, 220–222.

Friaa, O., Brault, D., (2006). "Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH• in semi-aqueous solution." *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4 (12), 2417–2423. <https://doi.org/10.1039/b602147f>

Gacesa, P., (1998). "Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future

prospects." *Journal of Microbiology*, 144 (5), 1133–1143.

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F., (2018). "Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods." *Frontiers in Microbiology*, 9 (898), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>

Gani Souliissa, A., Lombardo, B., Sari Widyarman, A., (2021). "Antibacterial and antibiofilm efficacy of pineapple hump (*Ananas comosus*) on *Porphyromonas gingivalis* in vitro." *Journal of Dentistry Indonesia*, 28 (3), 153–157. <https://doi.org/10.14693/jdi.v28i3.1267>

Garavand, F., Madadlou, A., Moini, S., (2017). "Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using high-performance liquid chromatography–diode array detector–electro-spray ionization–mass spectrometry as affected by ultrasound and microwave." *International Journal of Food Properties*, 20 (1), 19–29. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1099045>

García-Gonzalo, D., Pagán, R., (2015). "Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: A review." *Postdoc Journal*, 3 (6). <https://doi.org/10.14304/surya.jpr.v3n6.2>

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J., (2005). "Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5), 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>

Gharibi, S., Matkowski, A., Sarfaraz, D., Mirhendi, H., Fakhim, H., Szumny, A., Rahimmalek, M., (2023). "Identification of polyphenolic compounds responsible for antioxidant, anti-candida activities and nutritional properties in different pistachio (*Pistacia vera* L.) hull cultivars." *Molecules*, 28 (4772), 1–12.

Giamarellou, H., (2005). "Multidrug resistance in gram-positive bacterial that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)." *Clinical Microbiology and Infection, Supplement*, 11 (4), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01160.x>

Girennavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G. K., Pillai, S. D., Patil, B. S., (2008). "Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria." *International Journal of Food Microbiology*, 125 (2), 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.028>

Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A., (2005). "Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts." *Food Chemistry*, 92 (3), 521–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.020>

Gonca, S., Özidemir, S., Isik, Z., M'barek, I., Shaik, F., Dizge, N., Balakrishnan, D., (2022). "Synthesis of silver nanoparticles from red and green parts of the pistachio hulls and their various in-vitro biological activities." *Food and Chemical Toxicology*, 165 (February). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113170>

Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., Hatab, S. R., (2018). "Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms." *Frontiers in Microbiology*, 9 (JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>

Gunwantrao, B. B., Bhausaheb, S. K., Ramrao, B. S., Subhash, K. S., (2016). "Antimicrobial activity and phytochemical analysis of orange (*Citrus aurantium* L.) and pineapple (*Ananas comosus* Merr.) peel extract." *Annals of Phytomedicine : An International Journal*, 5 (2), 156–160. <https://doi.org/10.21276/ap.2016.5.2.22>

Haenni, M., Lupo, A., Madec, J.-Y., (2018). "Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp." *Microbiology Spectrum*, 6 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0008-2017>

Halvorsen, B. L., Carlsen, M. H., Phillips, K. M., Bøhn, S. K., Holte, K., Jr, D. R. J., (2006). "Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods." *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84 (1), 95–135.

Haque, S. K., (2021). "Extraction and characterization of oil from pistachio nutshell." *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65 (3), 347-356.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., (2002). "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

Hentzer, M., Eberl, L., Nielsen, J., Givskov, M., (2003). "Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections." *BioDrugs*, 17, 241-250.

Hewitt, L. M., Marvin, C. H., (2005). "Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents." *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 589 (3), 208–232. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.02.001>

Hidalgo, G. I., Almajano, M. P., (2017). "Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review." *Antioxidants*, 6 (1). <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>

Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., Fridkin, S. K., (2008). "Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007." *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29 (11), 996-1011.

Hirano, S., Asamizu, S., Onaka, H., Shiro, Y., Nagano, S., (2008). "Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein." *Journal of Biological Chemistry*, 283 (10), 6459–6466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708109200>

Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J., Hall, K. E., (2002). "Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*." *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92 (1), 111–120. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x>

Hosoya, K., Sakamoto, M., Akai, K., Mori, T., Kubo, T., Kaya, K., Okada, K., Tsujioka, N., Tanaka, N., (2008). "A novel chip device based on wired capillary packed with high performance polymer-based monolith for HPLC: Reproducibility in preparation processes to obtain long columns." *Analytical Sciences*, 24 (1), 149–154. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.149>

Houdt, R. Van, Michiels, C. W., (2010). "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface." *Applied Microbiology*, 109 (4), 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>

Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., (2020). "Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields." *Frontiers in Microbiology*, 11 (October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>

Huang, D., Boxin, O. U., Prior, R. L., (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Huang, H. N., Pan, C. Y., Chen, J. Y., (2018). "Grouper (*Epinephelus coioides*) antimicrobial peptide epinecidin-1 exhibits antiviral activity against foot-and-mouth disease virus in vitro." *Peptides*, 106 (July), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.07.003>

Huang, T., Qian, Y., Wei, J., Zhou, C., (2019). "Polymeric antimicrobial food packaging and its applications." *Polymers*, 11 (3). <https://doi.org/10.3390/polym11030560>

Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J., (2003). "Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing." *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 58 (11–12), 879–884. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1224>

Hudz, N., Yezerska, O., Shanaida, M., Sedláčková, V. H., Wieczorek, P. P., (2019). "Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts." *Pharmacia*, 66 (4), 209–215. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e38976>

Husain, F. M., Ahmad, I., Al-Thubiani, A. S., Abulreesh, H. H., AlHazza, I. M., Aqil, F., (2017). "Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing-Regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria." *Frontiers in Microbiology*, 8 (APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00727>

Husniah, I., Tri Umiana Soleha., (2023). "Antibacterial activity of honey pineapple peel extract (*Ananas comosus* [L] Merr.) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*." *WMJ (Warmadewa Medical Journal)*, 8 (1), 16–22. <https://doi.org/10.22225/wmj.8.1.5918.16-22>

Ioana Cotar, A., (2012). "Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs in the fight against *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Clinical Microbiology: Open Access*, 2 (4), 1000e111. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000e111>

Isabelle, M., Lee, B. L., Lim, M. T., Koh, W. P., Huang, D., Ong, C. N., (2010). "Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore." *Food Chemistry*, 120 (4), 993–1003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.038>

Jacob, S. J. P., Shenbagaraman, S., (2011). "Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the selected green leafy vegetables." *International Journal of PharmTech Research*, 3 (1), 148–152.

Jafari-Sales, A., Pashazadeh, M., (2020). "Antibacterial effect of methanolic extract of saffron petal (*Crocus sativus* L.) on some standard Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria in vitro." *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants*, 3 (1), 1–7. <https://doi.org/10.38093/cupmap.692879>

Jain, P., Kumari, S., Malik, A., (2017). "Inhibition of pyocyanin production in *pseudomonas aeruginosa* by natural antimicrobial compounds from herbal extracts." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10 (6), 389–392. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i6.18056>

Jakopič, J., Veberič, R., Štampar, F., (2009). "Extraction of phenolic compounds from

green walnut fruits in different solvents." *Acta Agriculturae Slovenica*, 93 (1), 11-15.

Janssens, J. C. A., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., Hermans, K., De Coster, D., Verhoeven, T. L., Marchal, K., Vanderleyden, J., De Vos, D. E., De Keersmaecker, S. C. J., (2008). "Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium." *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (21), 6639–6648. <https://doi.org/10.1128/AEM.01262-08>

Jatav, J., Bhattacharya, B., (2022). "Pineapple-peel waste to pineapple-peel based active food packaging film: paving the way for a sustainable environment." *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03104-w>

Jatav, J., Tarafdar, A., Saravanan, C., Bhattacharya, B., (2022). "Assessment of antioxidant and antimicrobial property of polyphenol-rich chitosan-pineapple peel film." *Journal of Food Quality*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8064114>

Javan, A. J., Javan, M. J., (2014). "Electronic structure of some thymol derivatives correlated with the radical scavenging activity: Theoretical study." *Food Chemistry*, 165, 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.073>

Jeong, S. H., Yeo, S. Y., Yi, S. C., (2005). "The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers." *Journal of Materials Science*, 40, 5407-5411.

Jett, B. D., Huycke, M. M., Gilmore, M. S., (1994). "Virulence of Enterococci." *Clinical Microbiology Reviews*, 7 (4), 462–478. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.462>

Jideani, V. A., Vogt, K., (2016). "Antimicrobial packaging for extending the shelf life of bread-A review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (8), 1313–1324. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.768198>

Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Karlowsky, J. A., Sahm, D. F., Wenzel, R. P., (2004). "Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit-A European and North American surveillance study (2000-2002)." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-3-14>

Joyanes, P., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., Hevia, A., Perea, E. J., (1999). "In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials." *Clinical Microbiology and Infection*, 5 (6), 382–386. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00160.x>

Kaila, V. R. I., Wikström, M., (2021). "Architecture of bacterial respiratory chains." *Nature Reviews Microbiology*, 19 (5), 319–330. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00486-4>

Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., You, M., (2023). "OXPHOS-targeting drugs in oncology: new perspectives." *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 27 (10), 939–952. <https://doi.org/10.1080/14728222.2023.2261631>

Karaoglu, E. C., Tarhan, L., (2022). "Pistachio (*Pistacia vera* L.) hull samples from Turkey: phenolic compounds, antioxidant properties, and cytotoxic activities against HeLa, MCF-7, OE-33, and ACC-201 cancer cell lines." *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16 (3), 2300–2313. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01316-2>

Kasprzak, M. M., Erxleben, A., Ochocki, J., (2015). "Properties and applications of flavonoid metal complexes." *RSC Advances*, 5 (57), 45853–45877. <https://doi.org/10.1039/c5ra05069c>

Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, Y. S., Mujtaba, M., Ilk, S., Akyuz, L., Salaberria, A. M., Labidi, J., Abdulqadir, A. H., Deligöz, E., (2018). "Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging." *RSC Advances*, 8 (8), 3941–3950. <https://doi.org/10.1039/c7ra12070b>

Keane, P. F., Bonner, M. C., Johnston, S. R., Zafar, A., Gorman, S. P., (1994). "Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo." *British journal of urology*, 73 (6), 687-691.

Keelara, S., Thakur, S., Patel, J., (2016). "Biofilm formation by environmental isolates of salmonella and their sensitivity to natural antimicrobials." *Foodborne Pathogens and Disease*, 13 (9), 509–516. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2145>

Kennedy, P., Brammah, S. Wills, E. (2010). "Burns, biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis." *Burns*, 36 (1), 49-56.

Kerr, K. G., Snelling, A. M., (2009). "*Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary." *Journal of Hospital Infection*, 73 (4), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>

Keser, S., (2014). "Antiradical activities and phytochemical compounds of firethorn (*Pyracantha coccinea*) fruit extracts." *Natural Product Research*, 28 (20), 1789–1794. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.942304>

Khan, M. S., Qais, F. A., Ahmad, I., (2018). "Quorum sensing interference by natural products from medicinal plants: Significance in combating bacterial infection." *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*, 417–445. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_20

Khare, S., DeLoid, G. M., Molina, R. M., Gokulan, K., Couvillion, S. P., Bloodsworth, K. J., Eder, E. K., Wong, A. R., Hoyt, D. W., Bramer, L. M., Metz, T. O., Thrall, B. D., Brain, J. D., Demokritou, P., (2020). "Effects of ingested nanocellulose on intestinal microbiota and homeostasis in Wistar Han rats." *NanoImpact*, 18 (November 2019), 100216. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100216>

Kilic, I. H., Sarikurkcu, C., Karagoz, I. D., Uren, M. C., Kocak, M. S., Cilkiz, M., Tepe, B., (2016). "A significant by-product of the industrial processing of pistachios: Shell skin-RP-HPLC analysis, and antioxidant and enzyme inhibitory activities of the methanol extracts of *Pistacia vera* L. shell skins cultivated in Gaziantep, Turkey." *RSC Advances*, 6 (2), 1203–1209. <https://doi.org/10.1039/c5ra24530c>

Kinayyigit, S., (2021). "Role of phenols and phenol derivatives in the synthesis of nanoparticles.

Kinayyigit, S., Philippot, K., (2014). "Organometallic approach for the synthesis of noble metal nanoparticles: towards application in colloidal and supported nanocatalysis." In *Metal Nanoparticles for Catalysis: Advances and Applications* (pp. 47-82). The Royal Society of Chemistry.

Kinayyigit, S., Lara, P., Lecante, P., Philippot, K., Chaudret, B., (2014). "Probing the surface of platinum nanoparticles with ¹³CO by solid-state NMR and IR spectroscopies." *Nanoscale*, 6 (1), 539-546.

Kipnis, Y., Papo, N., Haran, G., Horovitz, A., (2007). "Concerted ATP-induced allosteric transitions in GroEL facilitate release of protein substrate domains in an all-or-none manner." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (9), 3119–3124. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700070104>

Kjeldgaard, B., Listian, S. A., Ramaswamhi, V., Richter, A., Kiesewalter, H. T., Kovács, Á. T., (2019). "Fungal hyphae colonization by *Bacillus subtilis* relies on biofilm matrix components." *Biofilm*, 1 (August). <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100007>

Klipp, E., Nordlander, B., Krüger, R., Gennemark, P., Hohmann, S., (2005). "Integrative model of the response of yeast to osmotic shock." *Nature Biotechnology*, 23 (8), 975–982. <https://doi.org/10.1038/nbt1114>

Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., ... Aromaa, A., (2002). "Flavonoid intake and risk of chronic diseases." *The American journal of clinical nutrition*, 76 (3), 560-568.

Kobayakawa, S., Jett, B. D., Gilmore, M. S., (2005). "Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material." *Current Eye Research*, 30 (9), 741–745. <https://doi.org/10.1080/02713680591005959>

Koh, K. H., Tham, F. Y., (2011). "Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity." *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44 (2), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2009.10.001>

Kordbacheh, H., Eftekhari, F., Ebrahimi, S. N., (2017). "Anti-quorum sensing activity of *Pistacia atlantica* against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and identification of its bioactive compounds." *Microbial Pathogenesis*, 110, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.018>

Kothari, V., Sharma, S., Padia, D., (2017). "Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10 (8), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.022>

Kovács, Á. T., Dragoš, A., (2019). "Evolved biofilm: review on the experimental evolution studies of *Bacillus subtilis* pellicles." *Journal of Molecular Biology*, 431 (23), 4749–4759. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.005>

Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B. A., Hoffmann, R., Otvos, L., (2001). "The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding." *Biochemistry*, 40 (10), 3016–3026. <https://doi.org/10.1021/bi002656a>

Kumar, C. G., Anand, S. K., (1998). "Significance of microbial biofilms in food industry: a review." *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1–2), 9–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)

Kumar, R., Chandar, B., Madasamy, P., (2018). "Use of succinic & oxalic acid in reducing the dosage of colistin against New Delhi metallo-β-lactamase-1 bacteria." *Indian Journal of Medical Research*, 147 (January 2018), 97–101. <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR>

Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, S. W., (2011). "Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents." *Journal of Food Science*, 76 (3), R90–R102.

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02102.x>

Lalegani, S., Ahmadi Gavligi, H., Azizi, M. H., Amini Sarteshnizi, R., (2018). "Inhibitory activity of phenolic-rich pistachio green hull extract-enriched pasta on key type 2 diabetes relevant enzymes and glycemic index." *Food Research International*, 105 (August 2017), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.003>

Lamuela-Raventós, R. M., (2017). "Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity." *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, 107–115. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

Leid, J. G., Shirtliff, M. E., Costerton, J. W., Stoodley, P., (2002). "Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms." *Infection and Immunity*, 70 (11), 6339–6345. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6339-6345.2002>

Lewis, K. I. M., (2001). "Riddle of biofilm resistance." *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45 (4), 999–1007.

Léonard, L., Bouarab Chibane, L., Ouled Bouhedda, B., Degraeve, P., Oulahal, N., (2016). "Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments." *Frontiers in Microbiology*, 7, 1225.

Lichstein, H. C., Van De Sand, V. F., (1945). "Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*." *The Journal of Infectious Diseases*, 76 (1), 47-51.

Liu, R. H., (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action." *The Journal of nutrition*, 134 (12), 3479S-3485S.

Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G., Chen, J., (2012). "Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives." *Critical Reviews in Biotechnology*, 32 (4), 374–381. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.651428>

Liu, Y., Liang, X., Wang, S., Qin, W., Zhang, Q., (2018). "Electrospun antimicrobial polylactic acid/tea polyphenol nanofibers for food-packaging applications." *Polymers*, 10 (5). <https://doi.org/10.3390/polym10050561>

Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. A., Trbojevič, R., Fernandez, A., (2012). "Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging." *Trends in Food Science and Technology*, 24 (1), 19–29.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.001>

Lu, Y., Ma, Y., Wang, X., Liang, J., Zhang, C., Zhang, K., Lin, G., Lai, R., (2008). "The first antimicrobial peptide from sea amphibian." *Molecular Immunology*, 45 (3), 678–681. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.004>

Lubaina, A. S., Renjith, P. R., Kumar, P., (2019). "Antibacterial potential of different extracts of pineapple peel against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains." *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (S1), 66–70. <https://doi.org/10.31024/ajpp.2019.5.s1.5>

Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., Domingues, F., (2014). "Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids." *Biofouling*, 30 (1), 69–79. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.845878>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., (2006). "Microorganisms and microbiology." *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey (NJ): Pearson Prentice Hall, 1-20.

Magi, G., Marini, E., Brenciani, A., Di Lodovico, S., Gentile, D., Ruberto, G., Cellini, L., Nostro, A., Facinelli, B., Napoli, E., (2018). "Chemical composition of *Pistacia vera* L. oleoresin and its antibacterial, anti-virulence and anti-biofilm activities against oral Streptococci, including *Streptococcus mutans*." *Archives of Oral Biology*, 96 (September), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.09.013>

Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A., (2005). "Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases." *Current Opinion in Lipidology*, 16 (1), 77–84. <https://doi.org/10.1097/00041433-200502000-00013>

Matinise, N., Fuku, X. G., Kaviyarasu, K., Mayedwa, N., Maaza, M. J. A. S. S., (2017). "ZnO nanoparticles via *Moringa oleifera* green synthesis: Physical properties & mechanism of formation." *Applied Surface Science*, 406, 339-347.

Marković, Z., Amić, D., Milenković, D., Dimitrić-Marković, J. M., Marković, S., (2013). "Examination of the chemical behavior of the quercetin radical cation towards some bases." *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15 (19), 7370–7378. <https://doi.org/10.1039/c3cp44605k>

Martins, B. C., Rescolino, R., Coelho, D. F., Zanchetta, B., Tambourgi, E. B., Silveira, E., (2014). "Characterization of bromelain from ananas comosus agroindustrial residues purified by ethanol factional precipitation." *Chemical Engineering Transactions*, 37 (June), 781–786. <https://doi.org/10.3303/CET1437131>

Matsumoto-Nakano, M., (2018). "Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation." *Japanese Dental Science Review*, 54 (1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.08.002>

May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., Devault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., Rothmel, R. K., Misra, T. K., Chakrabarty, A. M., (1991). "Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: A key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients." *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (2), 191–206. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.2.191>

Miller, M. B., Bassler, B. L., (2001). "Quorum sensing in bacteria." *Annual Review of Microbiology*, 55 (1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

Miranda, P. S. D., Lannes-Costa, P. S., Pimentel, B. A. S., Silva, L. G., Ferreira-Carvalho, B. T., Menezes, G. C., Mattos-Guaraldi, A. L., Hirata, R., Mota, R. A., Nagao, P. E., (2018). "Biofilm formation on different pH conditions by *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitic milk." *Letters in Applied Microbiology*, 67 (3), 235–243. <https://doi.org/10.1111/lam.13015>

Mitchell, P., (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature*, 191 (4784), 144–148.

Mizuno, W. G., Jezeski, J. J., (1961). "Starter metabolism. V. The mechanism of acetoin formation as determined with C14-labeled substrates." *Journal of Dairy Science*, 44 (4), 579–588.

Mohamed, J. A., Huang, D. B., (2007). "Biofilm formation by Enterococci." *Journal of Medical Microbiology*, 56 (12), 1581–1588. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47331-0>

Mohammadi Moghaddam, T., Razavi, S. M. A., Malekzadegan, F., Ardekani, A. S., (2009). " Chemical composition and rheological characterization of pistachio green hull's marmalade." *Journal of Texture Studies*, 40 (2009), 390–405.

Mohiuddin, S. G., Ghosh, S., Kavousi, P., Orman, M. A., (2022). "Proton motive force inhibitors are detrimental to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." *Microbiology Spectrum*, 10 (4), 1–15. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02024-22>

Mohsenipour, Z., Hassanshahian, M., (2015). "The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria." *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8 (8).

Mokhtarpour, A., (2014). "Extraction of phenolic compounds and tannins from pistachio by-products." *Annual Research & Review in Biology*, 4 (8), 1330–1338. <https://doi.org/10.9734/arrb/2014/7793>

Molander, A., Reit, C., Dahlén, G., Kvist, T., (1998). "Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis." *International Endodontic Journal*, 31 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1998.t01-1-00111.x>

Mora-Pale, M., Bhan, N., Masuko, S., James, P., Wood, J., Mccallum, S., Linhardt, R. J., Dordick, J. S., Koffas, M. A. G., (2015). "Antimicrobial mechanism of resveratrol-trans-dihydrodimer produced from peroxidase-catalyzed oxidation of resveratrol." *Biotechnology and Bioengineering*, 112 (12), 2417–2428. <https://doi.org/10.1002/bit.25686>

Moradi, F., Hadi, N., Bazargani, A., (2020). "Evaluation of quorum-sensing inhibitory effects of extracts of three traditional medicine plants with known antibacterial properties." *New Microbes and New Infections*, 38, 100769. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100769>

Mørsetrø, T., Langsrud, S., Heir, E., (2013). "Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora." *Advances in Microbiology*, 03 (03), 255–264. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.33037>

Morey, A., Bowers, J. W. J., Bauermeister, L. J., Singh, M., Huang, T. S., Mckee, S. R., (2014). "Effect of salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, shelf life, meat quality, and consumer acceptability of beef frankfurters." *Journal of Food Science*, 79 (1), 54–60. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12220>

Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Lambré, C., Leblanc, J. C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Oskarsson, A., Parent-Massin, D., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., ... Younes, M., (2017). "Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives." *EFSA Journal*, 15 (6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>

Mukurumbira, A. R., Shellie, R. A., Keast, R., Palombo, E. A., Jadhav, S. R., (2022). "Encapsulation of essential oils and their application in antimicrobial active packaging." *Food Control*, 136 (October 2021), 108883. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108883>

Motelica, L., Ficai, D., Ficai, A., Oprea, O. C., Kaya, D. A., Andronescu, E., (2020). "Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and perspectives." *Foods*, 9 (10), 1438.

Muslim, S. N., Mohammed Ali, A. N., AL-Kadmy, I. M. S., Khazaal, S. S., Ibrahim, S. A., Al-Saryi, N. A., Al-saadi, L. G., Muslim, S. N., Salman, B. K., Aziz, S. N., (2018). "Screening, nutritional optimization and purification for phytase produced by *Enterobacter aerogenes* and its role in enhancement of hydrocarbons degradation and biofilm inhibition." *Microbial Pathogenesis*, 115 (2018), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.047>

Musthafa, K. S., Ravi, A. V., Annapoorani, A., Packiavathy, I. S. V., Pandian, S. K., (2010). "Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the n-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Chemotherapy*, 56 (4), 333–339. <https://doi.org/10.1159/000320185>

Müller, G., Kramer, A., (2008). "Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (6), 1281–1287. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn125>

Namrata, Y. S., Sharma, T., (2017). "Anti-microbial, Anti-oxidant activity and phytochemical screening of polyphenolic flavonoids isolated from peels of *Ananas comosus*." *International Journal of Engineering Research and Technology*, V6 (09), 285–298. <https://doi.org/10.17577/ijertv6is090176>

Narayanan, K. B., Sakthivel, N., (2010). "Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes." *Advances in colloid and interface science*, 156 (1-2), 1-13.

Nguyen, N. T. T., Nguyen, L. M., Nguyen, T. T. T., Liew, R. K., Nguyen, D. T. C., Tran, T. Van., (2022). "Recent advances on botanical biosynthesis of nanoparticles for catalytic, water treatment and agricultural applications: A review." *Science of the Total Environment*, 827. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154160>

Naqvi, S. A. Z., Irfan, A., Zahoor, A. F., Zafar, M., Maria, A., Chand, A. J., Ashfaq, S., (2020). "Determination of antimicrobial and antioxidant potential of agro-waste peels." *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 92 (2), 1–12. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181103>

Nealson, K. H., (1977). "Autoinduction of bacterial luciferase - Occurrence, mechanism and significance." *Archives of Microbiology*, 112 (1), 73–79. <https://doi.org/10.1007/BF00446657>

Nejatian, M., Ghandehari Yazdi, A. P., Khorasani, S., Simal-Gandara, J., (2023). "Increasing the shelf life of fresh in-hull pistachio using nanocomposite packaging of zinc nanoparticles and pistachio green hull essential oil." *Scientia Horticulturae*, 313 (October 2022), 111888. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111888>

Nile, S. H., Baskar, V., Selvaraj, D., Nile, A., Xiao, J., Kai, G., (2020). "Nanotechnologies in food science: applications, recent trends, and future perspectives." In *Nano-Micro Letters* Vol. 12, Issue 1. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-0383-9>

Noirot-Gros, M. F., Shinde, S. V., Akins, C., Johnson, J. L., Zerbs, S., Wilton, R., Kemner, K. M., Noirot, P., Babnigg, G., (2020). "Functional imaging of microbial interactions with tree roots using a microfluidics setup." *Frontiers in Plant Science*, 11 (April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00408>

Noumi, E., Snoussi, M., Merghni, A., Nazzaro, F., Quindós, G., Akdamar, G., Mastouri, M., Al-Sieni, A., Ceylan, O., (2017). "Phytochemical composition, anti-biofilm and anti-quorum sensing potential of fruit, stem and leaves of *Salvadora persica* L. methanolic extracts." *Microbial Pathogenesis*, 109, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.036>

Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V, Santo-buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., Barros, L., (2022). "Natural food colorants and preservatives : A review , a demand , and a challenge." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 2789–2805. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07533>

O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R., (2000). "Biofilm formation as microbial development." *Annu. Rev. Microbiol.*, 54 (1), 49–79.

Olakunle, O., Deborah, J., Irene, O., (2019). "Antifungal activity and phytochemical analysis of selected fruit peels." *Journal of Biology and Medicine*, 3 (1), 040–043. <https://doi.org/10.17352/jbm.000013>

Oliveira, B. D. Á., Rodrigues, A. C., Cardoso, B. M. I., Ramos, A. L. C. C., Bertoldi, M. C., Taylor, J. G., Cunha, L. R. da, Pinto, U. M., (2016). "Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract." *Industrial Crops and Products*, 84, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.037>

Olsen, B. A., Castle, B. C., Myers, D. P., (2006). "Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25 (8), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.06.005>

Omojate Godstime, C., Enwa Felix, O., Jewo Augustina, O., Eze Christopher, O., (2014). "Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens—a review." *J Pharm Chem Biol Sci*, 2 (2), 77-85.

Oskoueian, E., Karimi, E., Noura, R., Ebrahimi, M., Shafaei, N., Karimi, E., (2020).

"Nanoliposomes encapsulation of enriched phenolic fraction from pistachio hulls and its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-melanogenic activities." *Journal of Microencapsulation*, 37 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1692941>

Otter, J. A., Yezli, S., Schouten, M. A., Van Zanten, A. R. H., Houmes-Zielman, G., Nohlmans-Paulssen, M. K. E., (2010). "Hydrogen peroxide vapor decontamination of an intensive care unit to remove environmental reservoirs of multidrug-resistant gram-negative rods during an outbreak." *American Journal of Infection Control*, 38 (9), 754–756. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.03.010>

Owoeye, T. F., Akinlabu, D. K., Ajayi, O. O., Afolalu, S. A., Popoola, J. O., Ajani, O. O., (2022). "Phytochemical constituents and proximate analysis of dry pineapple peels." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 993 (1), 012027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/993/1/012027>

Ozay, Y., Ozdemir, S., Gonca, S., Canli, O., Dizge, N., (2021). "Phenolic compounds recovery from pistachio hull using pressure-driven membrane process and a cleaner production of biopesticide." *Environmental Technology and Innovation*, 24, 101993. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101993>

Özay, Y., (2014). "Antep fıstığı kabuklarının sıvılaştırma koşullarının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi

Özbek, H. N., Halahlih, F., Göğüş, F., Koçak Yanık, D., Azaizah, H., (2020). "Pistachio (*Pistacia vera* L.) hull as a potential source of phenolic compounds: Evaluation of ethanol–water binary solvent extraction on antioxidant activity and phenolic content of pistachio hull extracts." *Waste and Biomass Valorization*, 11 (5), 2101–2110. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0512-6>

Özçelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T., (2005). "Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*." *Microbiological Research*, 160 (2), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.11.002>

Ozdemir, O. O., Soyer, F., (2020). "*Pseudomonas aeruginosa* presents multiple vital changes in its proteome in the presence of 3-hydroxyphenylacetic acid, a promising antimicrobial agent." *ACS Omega*, 5 (32), 19938–19951. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00703>

Pankey, G. A., Sabath, L. D., (2004). "Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment of gram-positive bacterial infections." *Clinical Infectious Diseases*, 38 (6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/422881>

Peciuliene, V., Balciuniene, I., Eriksen, H. M., Haapasalo, M., (2000). "Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a lithuanian population." *Journal of Endodontics*, 26 (10), 593–595. <https://doi.org/10.1097/00004770-200010000-00004>

Persson, T., Givskov, M., Nielsen, J., (2005). "Quorum sensing inhibition: targeting chemical communication in Gram negative bacteria." *Current medicinal chemistry*, 12 (26), 3103-3115.

Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Ashraf-Khorassani, M., (2005). "Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24), 9436–9445. <https://doi.org/10.1021/jf051505h>

Poadang, S., Yongvanich, N., Phongtongpasuk, S., (2017). "Synthesis, characterization, and antibacterial properties of silver nanoparticles prepared from aqueous peel extract of pineapple, *Ananas comosus*." *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 16 (2), 123–133. <https://doi.org/10.12982/cmujns.2017.0010>

Pyrzynska, K., Pekal, A., (2011). "Flavonoids as analytical reagents." *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41 (4), 335–345. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.607077>

Rada, B., Leto, T. L., (2013). "Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections." *Trends in Microbiology*, 21 (2), 73–81.

Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., Hasan, M. M., (2008). "Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224." *Journal of Material Science and Technology*, 24, 192–196

Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A. M., Sahari, M. A., Esfahani, Z. H., (2010). "Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract." *Food and Chemical Toxicology*, 48 (1), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.023>

Ran, T., Gao, M., Wei, Q., He, J., Tang, L., Wang, W., Xu, D., (2015). "Expression, crystallization and preliminary crystallographic data analysis of VioD, a hydroxylase in the violacein-biosynthesis pathway." *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 71 (2), 149–152. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14027617>

Rathore, S. K., Bhatt, S., Dhyani, S., Jain, A., (2012). "Preliminary phytochemical screening of medicinal plant *Ziziphus mauritiana* Lam. fruits." *Academic Sciences*, 4 (3), 160–162.

Realini, C. E., Marcos, B., (2014). "Active and intelligent packaging systems for a modern society." *Meat Science*, 98 (3), 404–419.

Renner, L. D., Weibel, D. B., (2011). "Physicochemical regulation of biofilm formation." *MRS Bulletin*, 36 (5), 347–355. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>

Richards, M. J., Edwards, J. R., Culver, D. H., Gaynes, R. P., (2000). "Nosocomial Infections in Combined Medical-Surgical Intensive Care Units in the United States." *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21 (8), 510–515.

Rieger, B., Arroum, T., Borowski, M., Villalta, J., Busch, K. B., (2021). "Mitochondrial F₁F₀ ATP synthase determines the local proton motive force at cristae rims." *EMBO Reports*, 22 (12), 1–23. <https://doi.org/10.15252/embr.202152727>

Römling, U., Balsalobre, C., (2012). "Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies." *Journal of Internal Medicine*, 272 (6), 541–561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>

Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Casaccia, M., Maggio, F., Paparella, A., (2022). "Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (8), 2172–2191. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1851169>

Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. J., (1997). "Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain." *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6), 2421–2431. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2421-2431.1997>

Sadílek, P., Šatínský, D., Solich, P., (2007). "Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26 (5), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.002>

Salari Sedigh, S., Moghadam, G., Sadeghi, M., Khajehasani, F., Fatemi, I., (2021). "In vitro antimicrobial activities of pistachio hydroalcoholic extract against oral facultative anaerobes." *Pistachio and Health Journal*, 4 (3), 75–80. <https://doi.org/10.22123/PHJ.2021.309972.1111>

Salim, A., Deiana, P., Fancello, F., Molinu, M. G., Santona, M., Zara, S., (2023). "Antimicrobial and antibiofilm activities of pomegranate peel phenolic compounds: Varietal screening through a multivariate approach." *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 8 (2), 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2023.01.006>

Sánchez, E., García, S., Heredia, N., (2010). "Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*." *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (20), 6888–6894. <https://doi.org/10.1128/AEM.03052-09>

Sandoe, J. A. T., Witherden, I. R., Cove, J. H., Heritage, J., Wilcox, M. H., (2003). "Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo." *Journal of Medical Microbiology*, 52 (7), 547–550. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05201-0>

Saraswaty, V., Risdian, C., Primadona, I., Andriyani, R., Andayani, D. G. S., Mozef, T., (2017). "Pineapple peel wastes as a potential source of antioxidant compounds." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 60 (1), 2–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/60/1/012013>

Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., Greenberg, E. P., (2003). "Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis." *Journal of Bacteriology*, 185 (7), 2066-2079.

Seeram, N. P., Zhang, Y., Henning, S. M., Lee, R., Niu, Y., Lin, G., Heber, D., (2006). "Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (19), 7036–7040. <https://doi.org/10.1021/jf0614948>

Seguí Gil, L., Fito Maupoey, P., (2018). "An integrated approach for pineapple waste valorisation. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues." *Journal of Cleaner Production*, 172, 1224–1231. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.284>

Seifzadeh, N., Sahari, M. A., Barzegar, M., Gavligi, H. A., Calani, L., Del Rio, D., Galaverna, G., (2019). "Evaluation of polyphenolic compounds in membrane concentrated pistachio hull extract." *Food Chemistry*, 277 (August 2018), 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.001>

Semagina, N., Kiwi-Minsker, L., (2009). "Recent advances in the liquid-phase synthesis of metal nanostructures with controlled shape and size for catalysis." *Catalysis Reviews*, 51 (2), 147-217.

Semreen, M. H., El-Gamal, M. I., Abdin, S., Alkhazraji, H., Kamal, L., Hammad, S., El-Awady, F., Waleed, D., Kourbaj, L., (2018). "Recent updates of marine antimicrobial peptides." *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26 (3), 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.001>

Sepandj, F., Ceri, H., Gibb, A., Read, R., Olson, M., (2007). "Minimum inhibitory concentration versus minimum biofilm eliminating concentration in evaluation of antibiotic sensitivity of Enterococci causing peritonitis." *Peritoneal Dialysis International*, 27 (4), 464–465.

Seth, A., Devi, E., Thakur, K., Attri, C., Singh, V., Bhandari, A., ... Seth, M. K., (2022). "Himalayan fern *Cheilanthes bicolor* mediated fabrication and characterization of iron nanoparticles with antimicrobial potential." *BioNanoScience*, 12 (2), 486–495.

Sharma, D., Misba, L., Kan, A. U., (2019). "Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities." *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8 (76), 1–10.

Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., Hijji, Y. M., (2021). "Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation." *Lwt*, 150 (May), 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>

Sırıken, B., Veli, Öz, (2017). "*Pseudomonas aeruginosa*: özellikleri ve quorum sensing mekanizması." *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (18), 42–52.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M., (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent." In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic press. 14

Singleton, V. L., Rossi, J. A. J., (1965). "Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents." *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (48), 144–158. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AUG6900001.pdf>

Smeriglio, A., Denaro, M., Barreca, D., Calderaro, A., Bisignano, C., Ginestra, G., Bellocco, E., Trombetta, D., (2017). "In vitro evaluation of the antioxidant, cytoprotective, and antimicrobial properties of essential oil from *Pistacia vera* L. Variety Bronte Hull." *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061212>

Smith, K. M., Bu, Y., Suga, H., (2003). "Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer." *Chemistry & Biology*, 10 (June), 563–571. <https://doi.org/10.1016/S>

Socas-Rodríguez, B., Álvarez-Rivera, G., Valdés, A., Ibáñez, E., Cifuentes, A., (2021). "Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization." *Trends in Food Science and Technology*, 114, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>

Sochacki, K. A., Barns, K. J., Bucki, R., Weisshaar, J. C., (2011). "Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (16). <https://doi.org/10.1073/pnas.1101130108>

Song, X., Wang, L., Liu, L., Li, J., Wu, X., (2022). "Impact of tea tree essential oil and citric acid/choline chloride on physical, structural and antibacterial properties of chitosan-based films." *Food Control*, 141 (May), 109186. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109186>

Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., Selli, S., (2017). "Characterization and comparative evaluation of volatile, phenolic and antioxidant properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull." *Journal of Essential Oil Research*, 29 (3), 262–270. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1216899>

Sood, S., Davis, J., (2020). "Anti-biofilm activity of *Azadirachta indica* and *Ocimum sanctum* aqueous extract combination against MRSA." *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (4), 514–520. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2020.12.04.083>

Sorbiun, M., Shayegan Mehr, E., Ramazani, A., Mashhadi Malekzadeh, A., (2018). "Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant extracts and evaluation of their antibacterial properties." *Nanochemistry Research*, 3 (1), 1-16.

Steindler, L., Bertani, I., De Sordi, L., Schwager, S., Eberl, L., Venturi, V., (2009). "LasI/R and RhII/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants." *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (15), 5131-5140.

Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., Ren, Q., (2015). "Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide." *BMC Microbiology*, 15 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>

Streeter, K., Katouli, M., (2016). "*Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment." *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2 (1), 25–32. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>

Striednig, B., Hilbi, H., (2022). "Bacterial quorum sensing and phenotypic heterogeneity: how the collective shapes the individual." *Trends in Microbiology*, 30 (4), 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.09.001>

Sun, S., Li, H., Zhou, W., Liu, A., Zhu, H., (2015). "Bacterial quorum sensing inhibition activity of the traditional Chinese herbs, *Ficus carica* L. and *Perilla frutescens*." *Chemotherapy*, 60 (5-6), 379-383.

Taghizadeh, A., Rad-Moghadam, K., (2018). "Green fabrication of Cu/pistachio shell nanocomposite using *Pistacia vera* L. hull: An efficient catalyst for expedient reduction of 4-nitrophenol and organic dyes." *Journal of Cleaner Production*, 198, 1105–1119. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.042>

Tahrioui, A., Ortiz, S., Azuama, O. C., Bouffartigues, E., Benalia, N., Tortuel, D., Maillot, O., Chemat, S., Kritsanida, M., Feuilloley, M., Orange, N., Michel, S., Lesouhaitier, O., Cornelis, P., Grougnet, R., Boutefnouchet, S., Chevalier, S., (2020). "Membrane-interactive compounds from *Pistacia lentiscus* L. thwart *Pseudomonas aeruginosa* virulence." *Frontiers in Microbiology*, 11 (May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01068>

Tang, S. S., Prodhan, Z. H., Biswas, S. K., Le, C. F., Sekaran, S. D., (2018). "Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification." *Phytochemistry*, 154 (July), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.002>

Tang, X., Flint, S. H., Bennett, R. J., Brooks, J. D., Morton, R Hugh., (2009). "Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes." *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 36 (12), 1491–1497. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0637-5>

Talaro K. P., Chess B., (2008). "Foundations in microbiology." 8th Ed. *McGraw Hill*, New York

Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., Rather, M. A., (2019). "A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens." *Microbial Pathogenesis*, 134 (March), 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>

Tateda, K., Comte, R., Pechere, J. C., Köhler, T., Yamaguchi, K., Van Delden, C., (2001). "Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (6), 1930–1933.

<https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1930-1933.2001>

te Winkel, J. D., Gray, D. A., Seistrup, K. H., Hamoen, L. W., Strahl, H., (2016). "Analysis of antimicrobial-triggered membrane depolarization using voltage sensitive dyes." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4 (APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00029>

Thomas, W. E., Nilsson, L. M., Forero, M., Sokurenko, E. V., Vogel, V., (2004). "Shear-dependent “stick-and-roll” adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology*, 53 (5), 1545–1557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04226.x>

Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovino, C., Saija, A., (2010). "Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins." *Biochimie*, 92 (9), 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.027>

Tong, G., Yulongb, M., Peng, G., Zirong, X., (2005). "Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*." *Veterinary Microbiology*, 105, 113–122.

Topuzović, M. D., Radojević, I. D., Dekić, M. S., Radulović, N. S., Vasić, S. M., Čomić, L. R., Ličina, B. Z., (2015). "Phytomedicinal investigation of *Najas minor* All. in the view of the chemical constituents." *EXCLI Journal*, 14, 496–503.

Trindade, M. A., Nunes, C., Coimbra, M. A., Gonçalves, F. J., Marques, J. C., Gonçalves, A. M., (2022). "Sustainable and biodegradable active films based on seaweed compounds to improve shelf life of food products." In *Sustainable Global Resources of Seaweeds Volume 2: Food, Pharmaceutical and Health Applications* (235-252). Cham: Springer International Publishing.

Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Allende, A., (2009). "Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics." *Food Chemistry*, 115 (4), 1337–1344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.065>

Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., Allende, A., (2015). "Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors." *Trends in Food Science & Technology*, 43 (2), 189-204.

Tseng, C. P., Albrecht, J., Gunsalus, R. P., (1996). "Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and

anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 178 (4), 1094–1098. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1094-1098.1996>

Turrens, J. F., (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." *Bioscience Reports*, 17 (1), 3–8. <https://doi.org/10.1023/A:1027374931887>

Unlu, A., Sar, T., Seker, G., Erman, A. G., Kalpar, E., Akbas, M. Y., (2018). "Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains and their control by selected phytochemicals." *International Journal of Dairy Technology*, 71 (3), 637–646. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12520>

Üreyen Esertaş, Ü. Z., Kara, Y., Kiliç, A. O., Kolaylı, S., (2022). "A comparative study of antimicrobial, anti-quorum sensing, anti-biofilm, anti-swarming, and antioxidant activities in flower extracts of pecan (*Carya illinoensis*) and chestnut (*Castanea sativa*)." *Archives of Microbiology*, 204 (589), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03172-6>

Valderrey, A. D., Pozuelo, M. J., Jiménez, P. A., Maciá, M. D., Oliver, A., Rotger, R., (2010). "Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: Cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68 (1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.008>

Varposhti, M., Abdi Ali, A., Mohammadi, P., Saboora, A., (2013). "Effects of extracts and an essential oil from some medicinal plants against biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 1 (1), 36–40. <http://jommid.pasteur.ac.ir/article-1-38-en.html>

Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H., McLean, R. J. C., (2007). "Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors." *Fitoterapia*, 78 (4), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.009>

Venugopal, V., (2016). "Marine polysaccharides: Food applications." *CRC press*

Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., Jesudhasan, P. R., Pillai, S. D., Patil, B. S., (2010). "Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids." *Journal of Applied Microbiology*, 109 (2), 515–527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x>

Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I., Iglewski, B. H., (2003). "Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment." *Journal of Bacteriology*, 185 (7), 2080-2095.

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., (2009). "Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals." *Phytomedicine*, 16 (2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

Wang, W., Liu, J., Ren, Y., Zhang, L., Xue, Y., Zhang, L., He, J., (2020). "Phytotoxicity assessment of copper oxide nanoparticles on the germination, early seedling growth, and physiological responses in *Oryza sativa* L." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104 (6), 770–777. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02850-9>

Wang, T., Jin, X., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R., (2014). "Green synthesis of Fe nanoparticles using eucalyptus leaf extracts for treatment of eutrophic wastewater." *Science of the total environment*, 466, 210-213.

Watanabe, Y., Oshima, N., Tamai, Y., (2005). "Co-expression of the Na⁺/H⁺-antiporter and H⁺-ATPase genes of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Research*, 5 (4–5), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.11.001>

Weng, X., Huang, L., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R., (2013). "Synthesis of iron-based nanoparticles by green tea extract and their degradation of malachite." *Industrial Crops and Products*, 51, 342-347.

Wenzel, M., Kohl, B., Münch, D., Raatschen, N., Albada, H. B., Hamoen, L., Metzler-Nolte, N., Sahl, H. G., Bandow, J. E., (2012). "Proteomic response of *Bacillus subtilis* to lantibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (11), 5749–5757. <https://doi.org/10.1128/AAC.01380-12>

Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L., (2004). "Antioxidants and prevention of chronic disease." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (4), 275–295. <https://doi.org/10.1080/10408690490468489>

Williams, P., (2007). "Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world." *Microbiology*, 153 (12), 3923–3938. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0>

Wolcott, R., Costerton, J. W., Raoult, D., Cutler, S. J., (2013). "The polymicrobial nature of biofilm infection." *Clinical Microbiology and Infection*, 19 (2), 107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x>

Wright, G. D., (2010). "Q&A: Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it?" *BMC Biology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>

Wu, X., Prior, R. L., (2005). "Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (8), 3101–3113. <https://doi.org/10.1021/jf0478861>

Wu, Y., Liang, S., Zhang, M., Wang, Z., Wang, Z., Ren, X., (2020). The effect of chlorogenic acid on *Bacillus subtilis* based on metabolomics." *Molecules*, 25 (18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184038>

Yang, B., Tong, Z., Shi, J., Wang, Z., Liu, Y., (2023). "Bacterial proton motive force as an unprecedented target to control antimicrobial resistance." *Medicinal Research Reviews*, 43 (4), 1068–1090. <https://doi.org/10.1002/med.21946>

Yang, Q., Wang, L., Gao, J., Liu, X., Feng, Y., Wu, Q., Baloch, A. B., Cui, L., Xia, X., (2016). "Tannin-rich fraction from pomegranate rind inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and biofilm formation in *Escherichia coli*." *Foodborne Pathogens and Disease*, 13 (1), 28–35. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2027>

Yap, P. S. X., Yusoff, K., Lim, S. H. E., Chong, C. M., Lai, K. S., (2021). "Membrane disruption properties of essential oils-A double-edged sword?" *Processes*, 9 (4). <https://doi.org/10.3390/pr9040595>

Yuroff, A. S., Sabat, G., Hickey, W. J., (2003). "Transporter-mediated uptake of 2-Chloro- and 2-Hydroxybenzoate by *Pseudomonas hutchinsonii* strain D1." *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7401–7408. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7401-7408.2003>

Zahedifard, F., Lee, H., No, J. H., Salimi, M., Seyed, N., Asoodeh, A., Rafati, S., (2020). "Comparative study of different forms of Jellein antimicrobial peptide on *Leishmania parasite*." *Experimental Parasitology*, 209 (September 2019), 107823. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107823>

Zhou, Y., Huma, B., Tan, Z., (2023). "High-value utilization of polyphenol aromatic antimicrobial agents extracted from pineapple peel waste." *ACS Food Science and Technology*, 3 (5), 858–865. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00048>

ÖZGEÇMİŞ

Gamze ŞEKER, 2008 yılında Adana İncirlik Lisesi’den mezun oldu. Lisans eğitimini 2008-2013 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü (%30 İngilizce)’de devam ettirdi. 2013 yılınca Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde, 2015 yılında ise Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü’de yüksek lisans eğitime başladı. 2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne araştırma görevlisi olarak atanması nedeni ile yüksek lisans eğitimini burada 2017 yılında tamamladı ve aynı yıl doktora çalışmalarına başladı. Halen Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.



TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

Seker, G., Akbas, M. Y., (2023). “Evaluation of bioactivities of Pistacia vera L. hull extracts as a potential antimicrobial and antioxidant natural source.” *Food Science and Technology International*, 10820132231193478.

Seker, G., and Akbas, M. Y., (2022). “Effects of extraction methods on antimicrobial properties of pineapple peel.” *European Biotechnology Congress*, Prague, Czech Republic, October 5-7, 2022 (Oral presentation)

