TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MONOMİKROBİYAL VE KARMA-TÜR BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN SİNERJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu ŞİMŞEK

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MONOMİKROBİYAL VE KARMA-TÜR BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN SİNERJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu ŞİMŞEK

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

Bu proje Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 18L0237007 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2022

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Monomikrobiyal ve Karma-tür Biyofilm Oluşumu Üzerine Antimikrobiyal Ajanların Sinerjik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.
Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Duygu ŞİMŞEK
Tarih:
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Duygu ŞİMŞEK tarafından hazırlanan
"Monomikrobiyal ve Karma-tür Biyofilm Oluşumu Üzerine Antimikrobiyal Ajanların Sinerjik Etkilerinin Araştırılması"
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06.07.2022

İmza
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Nilgün ÜNAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Aslı ÖZKIRIM
Hacettepe Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankar Üniversitesi
Üye

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilmin Tarihçesi	2
1.2. Biyofilmin Yapısı ve Oluşumu	4
1.3. Biyofilmlerde Rekalsitrans	7
1.4. Biyofilmlerin Kantitatif Analizleri	9
1.4.1. Doğrudan Sayım Yöntemleri	9
1.4.1.1. Plakta Sayım	9
1.4.1.2. Akış Temelli Hücre Sayımı	10
1.4.1.3. Floresan Mikroskobu ile Sayım	10
1.4.1.4. Kofokal Taramalı Lazer Mikroskobu ile Sayım	11
1.4.2. Dolaylı Sayım Yöntemleri	11
1.4.2.1. Kuru Ağırlık Ölçümü	11
1.4.2.2. Total Organik Karbon Ölçümü	11
1.4.2.3. Kristal Viyole ile Boyanma	12
1.4.2.4. Tetrazolyum Tuzlarıyla Boyanma	12
1.4.2.5. Adenozin trifosfat (ATP) ile Biyolüminesans	12
1.4.2.6. Total Protein Hesaplanması	13
1.4.2.7. Kuvars Kristal Mikrobalans	13
1.5. Biyofilmleri Kalitatif Görselleştirme Yöntemleri	14
1.6. Karma-tür Biyofilmler	14
1.6.1. Karma-tür Biyofilmlerde Etkileşimler	14
1.6.2. Karma-tür Biyofilmlerle İlişkili Enfeksiyonlar	16
1.6.2.1. Dental Enfeksiyonlar	17
1.6.2.2. Alzaymır	18
1.6.2.3. Kistik Fibrozis	18
1.6.2.4. Kronik Bağırsak Yaraları ve Kolorektal Kanser	19
1.6.2.5. Otitis Media	20
1.6.2.6. Diyabet Kökenli Yara Enfeksiyonları	20
1.6.2.7. Endokardit	21
1.6.2.8. Tıbbi Cihaz Kullanımıyla İlişkili Enfeksiyonlar	21
1.6.2.8.1. Dolaşım İlişkili Septisemi	22
1.6.2.8.2. Ventilatör İlişkili Pnomoni	22
1.6.2.8.3. Kateter İlişkili Üriner Sistem Enfeksiyonları	23
1.6.3. Karma-tür Biyofilm İlişkili Enfeksiyonların Tedavisi	24
1.6.3.1. Antibiyotikler	24
1.6.3.2. Aşılar	25

1.6.3.3. Yüzey Kaplamaları 26
1.6.3.4. Probiyotikler 26
1.6.3.5. Faj Terapisi 27
1.6.3.6. Bitki Kökenli Bileşenler 27
1.6.3.6.1. Kuersetin 28
1.6.3.6.2. Kurkumin 29
1.6.3.6.3. Ögenol 29
1.6.3.6.4. Sinnemaldehit 30
1.6.3.6.5. Timol 30
1.7. *Klebsiella pneumoniae* 31
1.8. *Enterococcus faecalis* 33
1.9. *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* Karma-tür Biyofilmi 35

2. GEREÇ ve YÖNTEM 36
2.1. Klinik İzolatlar ve ATCC Suşları 36
2.1.1. İzolatların Tanımlanması 36
2.1.2. İzolatların ve ATCC Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Profili 37
2.1.3. Bakterilerin Biyofilm Kapasitesinin Tespiti 38
2.1.4. İzolatların Seçimi 39
2.1.5. Karma-tür Biyofilm Tutulumunun Gösterilmesi 40
2.1.6. Karma-tür Kültürde Üreme Eğrileri 40
2.2. Antimikrobiyal Aktivite Testleri 41
2.2.1. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler 41
2.2.2. Antibiyotik Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 41
2.2.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Kökenli Doğal Maddeler 42
2.2.4. Bitki Kökenli Doğal Maddelerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 42
2.2.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Tespiti 43
2.2.5.1. Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması 43
2.2.5.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi 43
2.2.6. Sinerji Testi 44
2.2.7. Time-kill (zamana bağlı ölüm) testi 45
2.3. Anti-Biyofilm Testleri 46
2.3.1. Kristal Viyole Yöntemi 46
2.3.2. Biyofilmin Kateter Tutulumunun Önlenimi 46
2.4. Metabolomik Etkileşim Deneyleri 47
2.4.1. Bakteri Süspansiyonları 48
2.4.2. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Antibakteriyel Aktivitesi 48
2.4.3. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Biyofilm İnhibisyonu Aktivitesi 49
2.4.4. Süpernatantların Antibakteriyel Aktivitesi 49
2.4.5. Metabolomik Analiz ile Laktik Asit Etkisinin Araştırılması 50
2.4.6. İstatistiksel Analizler 51

3. BULGULAR 52
3.1. Bakteri İzolatları 52
3.2. Bakterilerin Biyofilm Gelişimi 52
3.3. Bakterilerin Direnç Profilleri 52
3.4. Bakterilerin Biyofilm Kapasitesi 53
3.5. Karma-tür Tutulumun Gösterilmesi 54

3.6. Üreme eğrileri 54
3.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Değerleri 56
3.8. Sinerji Testi Sonuçları 57
3.9. Time Kill (Zamana Bağlı Ölüm) Testi Sonuçları 69
3.10. Anti-biyofilm Etki Testi Sonuçları 76
3.10.1. Kristal Viyole Yöntemi 76
3.10.2. Biyofilmin Kateter Tutulumunun Önlenimi 79
3.11. Metabolomik Etkileşim Deney Sonuçları 81
3.11.1. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Antibakteriyel Aktivitesi 81
3.11.2. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Antibiyofilm Aktivitesi 81
3.11.3. Süpernatantların Antibakteriyel Aktivitesi 82
3.11.4. Metabolomik Analiz ile Laktik Asit Etkisinin Araştırılması 82

4. TARTIŞMA 84

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 93
ÖZET 94
SUMMARY 95
KAYNAKLAR 96
EKLER 112
Ek-1. Etik Kurul Raporu 112
ÖZGEÇMİŞ 114

ÖNSÖZ

Binlerce yıldır doğada ya da hastane ortamları gibi insan müdahalesinin yoğun olduğu yerlerde insanlarla çeşitli etkileşimler içinde varlığını sürdüren mikroorganizmalar, holobiyontun önemli bir parçası olarak varlığını sürdürmektedir. Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların büyük bir kısmından oluşturdukları biyofilmler sorumlu tutulmaktadır. Biyofilmlerde rekalsitrans tedavi seçeneklerini sınırlandırmakta, tedavi sürecini zorlaştırmaktadır. Birden fazla türün oluşturduğu karma-tür biyofilmlerde heterojenliğin enfeksiyon süreçlerine etkisi üzerine araştırmalar ağırlık kazanmaktadır. Çalışmamızda üriner kateterlerden sıklıkla izole edilen *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* türlerinin karma-tür biyofilm içindeki metabolik etkileşimleri ve üriner sistem enfeksiyonlarında sıkça kullanılan antibiyotiklerin bazı bitki kökenli biyoaktif bileşenlerle kombinasyonunun bu biyofilm üzerine antibakteriyel ve Antibiyofilm etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü 18L0237007 no'lu projesi ile desteklenmiştir.

Doktora eğitimim süresince akademik çalışmalarımı destekleyen, kıymetli tecrübeleri ve önerileriyle çalışmalarıma yön veren değerli tez danışmanım Prof.Dr. Nurten ALTANLAR'a, planlama aşamasında deneyimlerini paylaşan sevgili arkadaşım Doç.Dr. Didem KART'a, deneysel çalışmalarım sırasında engin tecrübelerinden faydalanma fırsatı bulduğum hocalarım Prof.Dr. Aslı ÖZKIRIM'a ve Doç.Dr. Banu KAŞKATEPE'ye, imkânlarını ve bilgi birikimlerini paylaşarak metabolomik analizleri gerçekleştirmemizi sağlayan hocalarım Prof.Dr. Emirhan NEMUTLU, Doç.Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ ve Arş.Gör. Tuba REÇBER'e teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim sürecinde bana kazandırdıkları tüm bilgi ve tecrübeler için Fakültemizdeki bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çok kıymetli destekleri için arkadaşlarım Arş.Gör. Aygün SCHIESSER ve Arş.Gör. Merve ŞAVLUK'a tüm kalbimle teşekkür ederim. Bu süreçte manevi desteklerini hep hissettiğim Arş.Gör. Hilal Başak EROL ve Arş.Gör. Süleyman KAYAN'a ayrıca teşekkür ederim. Anneme, babama ve kardeşime yürekten sevgilerimle…

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)
ATP	Adenozintrifosfat
β	Beta
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute (Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
cm	Santimetre
ÇİD	Çoklu İlaca Dirençli
ddH_2O	Double Distilled H_2O (Çift distile su)
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
eDNA	Ekstraselüler DNA
EPS	Ekstraselüler Polisakkarit
EUCAST	European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi)
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
FTS	Fosfat Tamponlu Salin
g	Gram
GK-KS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HCl	Hidroklorik asit
Ka-MHB	Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth
KİÜSE	Kateter İlişkili Üriner Sistem Enfeksiyonları
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
Log	Logaritma
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteikoik asit

M	Molarite
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
mg	Miligram
MHA	Mueller-Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
NaCl	Sodyum klorür
OD	Optik Dansite
pH	Hidrojen gücü
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SEM	Scanning Electron Microscoby (Taramalı Elektron Mikroskobu)
s-SİB	Sıvı Sentetik İdrar Besiyeri
s-SİB-g	Sıvı Glukozlu Sentetik İdrar Besiyeri
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TSB-g	Glukozlu Tryptic Soy Broth
^{o}C	Santigrat derece
∞	Sonsuz
~	Yaklaşık
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi (1-Tersinir bağlanma, 2-Geri dönüşümsüz bağlanma, 3-Koloni gelişimi, 4-Olgunlaşma, 5-Dağılma) 5
Şekil 2. 1. Mikroplakta kombinasyon için örnek şablon 44
Şekil 3.1. K1E1 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi 55
Şekil 3.2. K2E2 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi 55
Şekil 3.3. K3E3 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi 55
Şekil 3.4. K4E4 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi 56
Şekil 3.5. Ampisilin-Kuersetin kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 69
Şekil 3.6. Ampisilin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 70
Şekil 3.7. Ampisilin-Ögenol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 70
Şekil 3.8. Ampisilin-Ögenol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği 70
Şekil 3.9. Ampisilin-Sinnemaldehit kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 71
Şekil 3.10. Ampisilin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 71
Şekil 3.11. İmipenem-Ögenol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 71
Şekil 3.12. İmipenem-Ögenol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği 72
Şekil 3.13. İmipenem-Sinnemaldehit kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 72
Şekil 3.14. İmipenem-Sinnemaldehit kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği 72
Şekil 3.15. İmipenem-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 73
Şekil 3.16. İmipenem-Timol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği 73
Şekil 3.17. Siprofloksasin-Kuersetin kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 73
Şekil 3.18. Siprofloksasin-Ögenol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 74
Şekil 3.19. Siprofloksasin-Ögenol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği 74

Şekil 3.20. Siprofloksasin-Sinnemaldehit kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 74
Şekil 3.21. Siprofloksasin-Sinnemaldehit kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği 75
Şekil 3.22. Siprofloksasin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 75
Şekil 3.23. Siprofloksasin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği 75
Şekil 3.24. Bakterilerin doğal biyofilm görüntüleri (a: E1, b: E2, c: E3, d: E4, e: K1, f: K2, g: K3, h: K4; i: E1K1, j: E2K2, k: E3K3, l: E4K4) 79
Şekil 3.25. Biyofilm oluşumunda azalma gözlemlenen örneklere ait SEM görüntüleri (a: Ampisilin+Sinnemaldehit – E1, b: Ampisilin+Sinnemaldehit – E1K1, c: Ampisilin+Sinnemaldehit E2K2, d: Ampisilin-Ögenol – K1, e: Siprofloksasin-Sinnemaldehit – K2, f: İmipenem-Timol – K1, g: İmipenem-Timol – K2, h: İmipenem-Sinnemaldehit – K1, i: İmipenem-Ögenol – K2, j: İmipenem-Ögenol – K3) 80

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. *K. pneumoniae* taksonomi sınıflandırması 32
Çizelge 1.2. *E. faecalis* taksonomi sınıflandırması 34
Çizelge 2.1. Biyofilm kapasitelerinin optik yoğunluk cinsinden sınır değerleri 39
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan klinik izolatların ve standart ATCC suşlarının adlandırılması 40
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, çözücüleri ve sulandırıcıları 41
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan bitki kökenli doğal maddeler, çözücüleri ve sulandırıcıları 42
Çizelge 2.5. FİK indeksi değerlerinin sınıflandırması 45
Çizelge 2.6. Sıvı Sentetik İdrar Besiyeri bileşimi 48
Çizelge 3.1. *E. faecalis* için disk difüzyon testi sonuçları (mm) 53
Çizelge 3.2. *K. pneumoniae* için disk difüzyon testi sonuçları (mm) 53
Çizelge 3.3. *E. faecalis* için biyofilm oluşturma kapasitesi 54
Çizelge 3.4. *K. pneumoniae* için biyofilm oluşturma kapasitesi 54
Çizelge 3.5. Bakterilerin test edilen antimikrobiyaller için MİK değerleri (μg/ml) 57
Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları 59
Çizelge 3.7. Sinerji testinde monomikrobiyal grup için etki düzeyleri (Duncan testi) 67
Çizelge 3.8. Sinerji testinde karma-tür grup için etki düzeyleri (Duncan testi) 68
Çizelge 3.9. Sinerji testinde monomikrobiyal ve karma-tür grup kıyaslaması (Oneway ANOVA testi) 68
Çizelge 3.10. Sinerji testinde tüm gruplar arası etki düzeyi kıyaslaması (Duncan testi) 69
Çizelge 3.11. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği antibiyofilm testi sonuçları 77

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde hücresel forma sahip canlılar arasında bakteriler biyokütle bakımından yaklaşık 70 milyar ton karbon ile ikinci en büyük grubu oluşturmaktadır (Bar-On ve ark., 2018). Sularda, sedimentlerde, topraklarda serbest olarak veya bitki ve hayvanlarla ilişkili olarak yaşayabilmektedirler (Thompson ve ark., 2017). Değişen çevre koşullarına uyum sağlamak için milyonlarca yıldır evrim geçirmekte (Brooks ve ark., 2011), binlerce yıldır insanlarla etkileşim içinde adaptasyonlarını sürdürmektedirler (Achtman, 2016). Adaptasyon kapsamlı bir süreçtir ve ekolojik fırsatlar ile bakterilerin genotipik ya da fenotipik pek çok evrimsel avantajları bu sürecin şekillenmesine katkıda bulunmaktadır (Ryall ve ark., 2012; Scheuerl ve ark., 2020). Adaptasyon sürecinde etkili faktörler temel olarak değişimden önce strese maruz kalma, değişim öncesi büyüme hızı ve büyüme aşaması, popülasyon büyüklüğü ve kültür yoğunluğu, önceki faz (serbest hareket veya durgun faz gibi), popülasyonlar içindeki fenotipik varyasyon ve genetik heterojenlik şeklinde gruplandırılabilir. Ayrıca, bakteriyel genom hem mutasyon olasılıklarını, hem de ortamlara verilen yanıtları kodlama kapasitelerini etkilemektedir (Ryall ve ark., 2012).

Doğada ya da hastane ortamları gibi insan müdahalesinin yoğun olduğu yerlerde gerçekleşen biyotik etkileşimler evrimsel tepkileri değiştirebilmektedir. Faydalı mikroorganizmalar holobiyontun önemli bir parçası olarak insan, hayvan ve bitki konakçılarıyla ilişkili biyofilmler oluştururken; bunun tersine, biyofilmler ayrıca enfeksiyonların da yaklaşık %65-80'inden sorumlu tutulmaktadır (Carthey ve ark., 2020; Pinto ve ark., 2021). Biyofilmler, antimikrobiyal tedavilere karşı artan dirençle ilişkileri nedeniyle, sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonların tedavisinde problem yaratmaktadır (Percival ve ark., 2015). Hastanelerde ve uzun süreli bakım tesislerinde sıkça uygulanan üriner kateterizasyonda idrar gibi sıcak besleyici bir ortamın akışı varlığında gelişen bakteriyel kolonizasyon potansiyel antibiyotiğe dirençli bakteri kaynağı olarak sağlık hizmetleri sistemi için büyük maliyetler oluşturmaktadır (Azevedo ve ark., 2017; Galvan ve ark., 2016). Hastaneye yatışla

ilişkili (nozokomiyal) enfeksiyonlar arasında Kateter İlişkili Üriner Sistem Enfeksiyonları (KİÜSE) dünya genelinde en sık rastlanan gruptur. Bu grup içinde karma-tür tutulum oranı %80'in üzerindedir (Armbruster ve ark., 2014). Saf kültür çalışmalarının sona yaklaştığı ve heterojenliğin enfeksiyon süreçlerine nasıl katkıda bulunduğuna dair araştırmaların enfeksiyonların teşhisi ve bunlarla mücadele konusundaki düşünceleri etkileyeceği belirtilmektedir (Scheuerl ve ark., 2020). Ancak üriner kateterlerde karma-tür biyofilm tutulumu gösterilen üropatojenlerin türler arası etkileşimiyle ilgili araştırma sayısı çok azdır (Galvan ve ark., 2016). Son yıllarda bu konuya olan ilgi giderek artmaktadır.

Klebsiella spp. ve *Enterococcus spp.* üriner kateterlerden en sık izole edilen türler arasında olup, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* karma-tür biyofilm kolonizasyonu gösterebilmektedirler (Galvan ve ark., 2016). Çalışmamıza temel oluşturan iki türün karma-tür biyofilm kolonizasyonu üzerinde iki ana hedefin araştırılması amaçlanmıştır. Birincisi, üriner sistem enfeksiyonlarında sıkça kullanılan antibiyotiklerin bazı bitki kökenli biyoaktif bileşenlerle kombinasyonunun bu karma-tür biyofilm oluşumu üzerine antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesidir. İkincisi, bu iki türün biyofilm içindeki metabolik etkileşimlerinin incelenmesidir.

1.1. Biyofilmin Tarihçesi

Mikroorganizmaların bilimsel keşfi 17'nci yüzyıla dayanmaktadır. Anthony van Leeuwenhoek 1676 yılında ele aldığı Londra Kraliyet Cemiyeti raporunda yağmur suyundan aldığı örneği incelediğinde, *animakül* dediği, çok küçük hayvanlar gördüğünü yazmıştır. Daha popüler olan 1684 yılındaki raporunda ise dişleri üzerindeki beyaz tabakayı mikroskop altında incelediğinde yaşayan küçük hayvanlar gördüğünü, üzüm sirkesi ile gargara yaptığında tabakanın sadece dış yüzündekilerin öldüğünü belirtmiştir. Bu canlıların çok fazla birikimine dikkat çekmek için "*Bir erkeğin dişlerindeki bu hayvanların sayısının, krallıktaki erkeklerin sayısını aştığına inanıyorum*" ifadesini kullanmıştır (Fred, 1933).

İki yüzyıl kadar sonra Louis Pasteur 1864 yılında şarap mayalanması üzerine yaptığı bir araştırmada fıçıların yüzeyindeki yapışkan zar diye tanımladığı bakteri yığınlarını sirkeyi asetik yapan etken olarak tanımlamıştır (Høiby, 2014).

Leeuwenhoek ve Pasteur tarafından yapılan tasvirlerin ötesinde sıvı ortamlardaki bakterilerin katı yüzeylere tutunmasına dair erişilebilen en eski kaynak animaküllerin bahsinden yaklaşık iki yüz elli yıl kadar sonrasında, 1933 yılında yapılan çalışmaya aittir (Henrici, 1933). Burada bakterilerin cam yüzeylerde oluşturduğu "film" tabakası belirtilmiştir. Aynı dönemlerde Heukelekian ve Heller bakteriyel gelişim üzerine yüzey etkisini araştırmış, bakteriyel tabaka katı bir yüzeye tutunduğunda, biyolojik reaksiyon oranının büyük ölçüde hızlandığını gözlemlemişlerdir (Heukelekian ve Heller, 1940). Claude ZoBell ve çalışma arkadaşları ise 1930'lar ve 1940'lardaki yayınlarında bakteriyel tutunmaya dair temel özelliklerin çoğunu açıklamıştır (Zobell, 1943; Zobell ve Allen, 1935; Zobell ve Anderson, 1936).

Biyofilm ifadesinin terim olarak ilk kullanımına "Damlama filtresinde mikrobiyal film gelişimi" konusunu ele alan yayında rastlanmaktadır (Mack ve ark., 1975). Denizcilik ve su araştırmaları gibi konularda mikrobiyal filmlerden daha yaygın olarak bahsedilen bu dönemde, insan sağlığı odağında kistik fibrozlu hastaların balgam örneklerindeki mukoid *Pseudomonas aeruginosa* kümelenmelerine dikkat çekilmiştir (Høiby, 1974; Høiby ve Axelsen, 1973). Biyofilm alanında mihenk taşlarından Bill Costerton 1978 yılındaki yayınında patojen bakterilerin dişlerin yüzeyinde, üriner sistemde ve cilt üzerinde tutunmasında glikokaliks yapısının etkisinden bahsetmiştir (Costerton ve ark., 1978). Medikal alanda biyofilm terimini ise ilk kez 1985 yılındaki yayınlarında kullanmış ve üriner kateterde sesil formdaki (biyofilm içinde) bakterilerde tobramisin direncinin planktonik formdaki (serbest yüzen) bakterilere göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Nickel ve ark., 1985). Høiby ve Costerton sonraki yıllarda daha gelişmiş mikroskobik yöntemlerin yanında, biyofilm araştırmaları için geliştirilen aletlerle, mutant bakterilerle desteklediklerı çalışmalarda kronik enfeksiyonlarda veya tıbbi cihazlar gibi yabancı maddeler varlığında biyofilm oluşumu üzerine çok sayıda araştırma yürütmüş ve mikrobiyal

enfeksiyonlarda dikkati biyofilmler üzerine çekmişlerdir. İlk biyofilm konferansı 1996 yılında Costerton tarafından Amerika Mikrobiyoloji Cemiyeti adına düzenlenmiştir (Høiby, 2014).

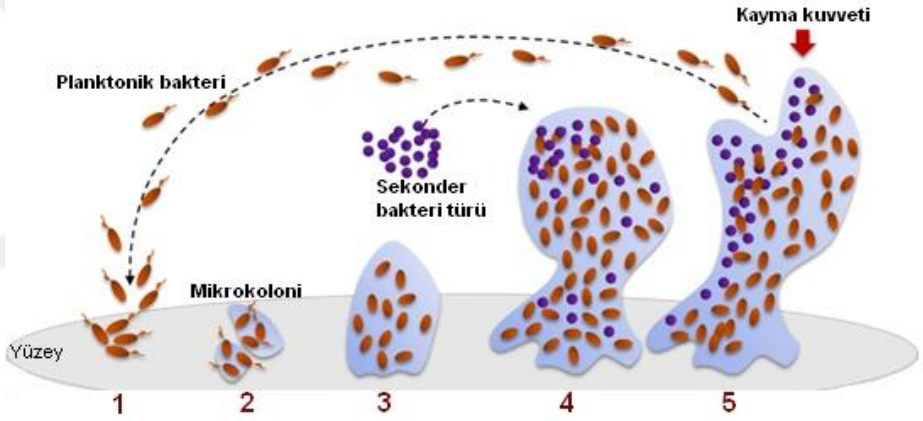
Çalışmalar günümüzde atık su filtrasyonu, endüstriyel ekipmanın biyolojik kirliliği, mikrobiyal korozyon, tıbbi cihaz ilişkili enfeksiyonlar, kronik yara enfeksiyonları, petrol geri kazanımı gibi alanlarda yoğunlaşmıştır. Teknolojik gelişmelerin sağladığı yeni araçlar ve tekniklerin ışığı altında biyofilmler üzerine geniş bir alanda fenotipik, genotipik ve metabolomik araştırmalar gerçekleştirilmektedir.

1.2. Biyofilmin Yapısı ve Oluşumu

Biyofilm, bir ara yüzeye (katı-sıvı, sıvı-sıvı ve sıvı-hava) bağlanmış, hücre dışı matris ile çevrili mikroorganizmalardan oluşan ve çevresi ile etkileşime giren karmaşık, üç boyutlu organize koloniler şeklinde tanımlanabilir (Belas, 2014; Even ve ark., 2017; Subbiahdoss ve Reimhult, 2020; Wilson ve ark., 2017). Biyofilm matrisi supramoleküler yapılar oluşturan proteinler, polisakkaritler, DNA, RNA, su ve iyonları içeren kolloidal bir yapıdır (Even ve ark., 2017; Jamal ve ark., 2018). Ekstraselüler polisakkarit (EPS) matrisin viskoelastik özelliği çevresel stres faktörlerine dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (Gebreyohannes ve ark., 2019). Hemen hemen tüm doğal veya yapay ortamlarda çok geniş yüzey alanlarını kolonize edebilmektedirler (Even ve ark., 2017).

Biyofilmin oluşumu karmaşıktır ancak temelde birkaç ortak adımda gerçekleşmektedir. Bu adımları (*i*) planktonik mikroorganizmaların yüzeye ilk tersinir bağlanması, (*ii*) geri döndürülemez şekilde bağlanma, (*iii*) mikro-kolonilerin geliştirilmesi, (*vi*) hücre dışı polimerik maddelerin salgılanmasıyla üç boyutlu olgun biyofilm topluluğunun geliştirilmesi ve (*v*) mikroorganizmaların biyofilmden dağılması şeklinde özetlemek mümkündür (Seneviratne ve ark., 2017). Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi Şekil 1.1.'de sunulmaktadır.

Yüzeylerin özellikleri ilk tutunma aşamasında önemli bir rol oynamaktadır. Fimbria, pili ve flagella gibi bakteriyel yüzey uzantıları, bakterinin yüzey algılamasını kolaylaştırarak hemen hemen tüm abiyotik ve biyotik yüzeylere yapışmasına olanak tanımaktadır. Yüzeyin hidrofobikliği, bakteri ve yüzey arasındaki itme kuvvetini azalttığı için tutunmayı güçlendirmede rol almaktadır. Hidrofilik ve polar yüzeylere kıyasla, hidrofobik ve polar olmayan yüzeylere bağlanma olasılığı daha yüksektir. Bir yüzeye mikrobiyal tutunmayı belirleyen kritik yakınlık mesafesinde (≤1 nm) elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, sıcaklık ve hidrodinamik kuvvetler gibi çekici ve itici kuvvetlerin net toplamı yapışma sürecini belirlemektedir (Jamal ve ark., 2018; Seneviratne ve ark., 2017).



Şekil 1.1. Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi (1-Tersinir bağlanma, 2-Geri dönüşümsüz bağlanma, 3-Koloni gelişimi, 4-Olgunlaşma, 5-Dağılma) (Pinto ve ark., 2020)

İlk bağlanma gerçekleştikten sonra, geri dönüşü olmayan bağlanma aşaması başlar. Adezinler olarak adlandırılan bakteri yüzey proteinleri ve pili gibi uzantılar bu aşamada önemli role sahiptirler. Canlı yüzeyler söz konusu olduğunda pili ve fimbria üzerinde bulunan reseptöre özgü ligandlar da yüzeye kilitlenmede görev almaktadır. Yüzey yükü, yüzey serbest enerjisi, pürüzlülük, hidrofobiklik, konfigürasyon topografyası ve sertliği gibi yüzey özellikleri de bu aşamada etkili faktörler arasında yer almaktadır. Birden fazla türün bulunduğu ortamlarda topluluk içinde rekabet veya sinerji oluşabilmektedir. Türlerden birinin diğerleri için birden

fazla bağlanma bölgesi taşıyarak köprü oluşturması sonucu birbirine yapışarak kümelenme meydana gelebilmektedir (Seneviratne ve ark., 2017).

Bir yüzeye geri dönüşümsüz yapışmanın ardından, EPS içindeki belirli kimyasal sinyallerle indüklenen mikrobiyal hücrelerin çoğalma ve bölünme süreci başlar. Hücre dışı matriste iç içe geçmiş mikrokoloniler ile karakterize üç boyutlu ağ içinde hücreler arası iletişim söz konusudur. Gram-pozitif bakterilerde lipoteikoik asitin (LTA), elektrostatik kuvvetler yoluyla diğer yüzey polimerleri ile etkileşime girdiği düşünülmektedir. Ayrıca bazı türlerde yüzey hidrofobikliğinin değiştirilmesi yoluyla dolaylı yoldan da etki ettiği bilinmektedir. Bazı Gram-negatif bakteride bağlanma, spesifik adezinler tarafından güçlendirilmektedir. Salgılanan ekstraselüler DNA (eDNA), pozitif yüklü yüzey molekülleri ile etkileşime girdiği için önemli bir etkendir. Canlı yüzeylerde ise bu aşamada konak matris proteinleri ile etkileşime girecek proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Biyofilm toplulukları genellikle birçok yönden birbirleriyle koordine olan birden fazla türden oluşmaktadır. Substrat değişimi, metabolik ürünlerin dağılımı ve metabolik son ürünlerin atılımında görev paylaşımı olmaktadır. Biyofilmler, belirli substratların kullanımı için metabolik özellikleri birbirinden farklı iki veya daha fazla bakterinin sintrofik gelişimi için uygun ortamı sağlamaktadır (Jamal ve ark., 2018; Seneviratne ve ark., 2017).

Mikrokolonilerin oluşturduğu organize topluluğun sonraki aşaması olgunlaşmadır. Hücreler, oto-indükleyici sinyaller aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurmaktadır. EPS oluşumu için gerekli belirli gen ürünleri eksprese edilmektedir. EPS iskeletindeki ara boşluklar suyla doldurulmaktadır. Böylece su ve besin maddelerinin dağıtımıyla, atık ürünlerin uzaklaştırılması için dolaşım ağı oluşturulmaktadır. Biyofilm mimarisini belirleyen olgun EPS yapısı çevresel faktörlerle şekillenmektedir. Olgun şeklini alan biyofimler, uzaysal-zamansal konumlarına bağlı olarak farklı seviyelerde metabolik aktiviteye sahip birkaç katmandan oluşan matrise gömülü heterojen hücre popülasyonlarıdır. Çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler metabolik açıdan alt katmanların daha hareketsizken, orta ve üst katmanların daha yüksek düzeyde aktivite gösterdiğini belirtmektedir. Biyofilm yaşlandıkça da belirli hücre popülasyonları

sessizleşmektedir. Persister olarak adlandırılan bu bir nevi uykudaki hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı daha yüksek seviyelerde direnç göstermektedir (Jamal ve ark., 2018; Seneviratne ve ark., 2017).

Bir biyofilmin yaşam döngüsündeki son aşama, hücrelerin farklı bir yüzeye kolonize olmak üzere olgun biyofilmden ayrıldığı dağılma aşaması olarak adlandırılmaktadır. Mekanizmanın en karmaşık basamağı olduğu söylenebilir. Bazı bakteriyel ikincil haberci moleküller dağılma için sinyaller sağlamaktadır. Dağılım sinyali veren faktörler, türden türe ve çevresel koşullara bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Bazı türlerde hücre dışı polisakkarit üretimi durup, bakteri doğrudan çevreye dağılırken, bazı durumlarda pasif faktör olarak kayma geriliminde türbülansın artışı olaya dâhil olabilmektedir. Ayrılma sırasında hücreler çeşitli enzimler üreterek EPS tabakasından kopmayı kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda hareket organeline sahip türlerde yüzeye tutunma sonrası baskılanan bu organelin oluşumu ile ilişkili gen ekspresyonu başlamaktadır. Canlı konakta, ayrılan hücrelerin yeni bölgelerde tutunması enfeksiyonun yayılmasına ya da ikincil biyofilm enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Jamal ve ark., 2018; Seneviratne ve ark., 2017).

Biyofilm oluşturan bakterilerden insanlarda patojenliği nedeniyle en sık çalışılanlar arasında tıbbi cihazlarda hastane enfeksiyonlarının ana etkenlerinden *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*; solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan *Streptococcus spp.* ve *P. aeruginosa;* uzun süreli bakım tesisleri ve hastanelerde başta KİÜSE olmak üzere çeşitli enfeksiyonların başlıca etkeni olan *Acinetobacter baumannii*; *K. pneumoniae* ve *Escherichia coli* yer almaktadır (Percival ve ark., 2015; Römling ve Balsalobre, 2012).

1.3. Biyofilmlerde Rekalsitrans

Antibiyotiklere karşı biyofilm direnci, bakterisidal veya bakteriyostatik ajanların varlığında bakterinin gelişimine izin veren genetik olarak kodlanmış

mekanizmalar yardımıyla minimum inhibitör konsantrasyondan (MİK) daha yüksek bir konsantrasyonda gelişmeye devam etme kapasitesi olarak tanımlanabilirken; antibiyotiklere tolerans, ya kalıtsal olarak kodlanmış biçimde ya da kalıtsal olmayan mekanizmalarla geçici olarak bakterisidal bir antimikrobiyal ajanın varlığında bakterinin hayatta kalabilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Biyofilmler antimikrobiyallere hem direnç hem de tolerans geliştirmektedir. Bu nedenle, son dönemlere ait literatürde biyofilmlerin antibiyotiklere duyarlılığının azalmasını tanımlamak için inatçılık anlamına gelen rekalsitrans terimi kullanılmaktadır (Balaure ve Grumezescu, 2020; Orazi ve O'Toole, 2019).

Biyofilmler antimikrobiyallere karşı oldukça rekalsitranttır. Buna neden olan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ancak çeşitli nedenler öne sürülmektedir. Planktonik hücrelere kıyasla, sesil formda yatay gen aktarımı daha yüksektir (Molin ve Tolker-Nielsen, 2003) ve mutasyon önemli ölçüde daha sık görülmektedir (Driffield ve ark., 2008). Bu da antibiyotik direncinin gelişimini desteklemektedir. Ayrıca, biyofilm matriksine penetrasyonun daha zayıf olması antibiyotiğin hücre içi konsantrasyonunu indirerek bir difüzyon bariyeri oluşturmakta ve nötrleştirici görev görmektedir (Donlan ve Costerton, 2002; Lewis, 2001). Olgun bir biyofilm matrisinde kimyasal mikroçevrenin değişimi, katmanlar arasında besin gradyanı ve oksijenin azalması sonucu metabolik aktivitenin değişmesi ile gelişimin yavaşlaması, aktif büyüme evresinde etkili olan antimikrobiyallere karşı toleransı açıklayabilmektedir (Donlan ve Costerton, 2002; Dunne, 2002; Patel, 2005). Örneğin, *S. aureus*'ta virülans faktörlerini, biyofilm oluşumunu, antibiyotik direncini düzenleyerek patogenezde önemli bir rol oynayan *agr* sisteminin bir parçası olan agr-II geninin üretimi, *P. aeruginosa* ile karma-tür biyofilminde artmaktadır (Matias ve ark., 2018; Tan ve ark., 2018). Çeşitli gruplardan antibiyotiklerin sub-inhibitör konsantrasyonlarının doza bağlı şekilde biyofilm oluşumunu indüklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Bernardi ve ark., 2021; Hoffman ve ark., 2005; Kaplan ve ark., 2012; Kuehl ve ark., 2009; Sato ve ark., 2018; Sritharadol ve ark., 2018; Weiser ve ark., 2016; Yu ve ark., 2018). Sub-inhibitör konsantrasyonlarda gözlemlenen biyofilm artışının altında yatan mekanizmalar için döngüsel diguanilat seviyesindeki değişiklikler (Hoffman ve ark., 2005), hücrelerarası matris bağlayıcı protein

üretiminde artış (Kuehl ve ark., 2009; Weiser ve ark., 2016) ya da artan hücre lizisi ve ekstraselüler genetik materyal (Yu ve ark., 2018) gibi metabolik yanıtlar işaret edilmiş olsa da mikroorganizma türüne ve antibiyotiğe bağlı olarak değişen etki-tepki mekanizması hala çok bilinmeyenli bir denklem olarak aydınlatılmayı beklemektedir.

Biyofilmlerin tedavide planktonik bakterilere kıyasla 500 – 5000 kat daha yüksek dozda antibiyotik gerektirdiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle, bu tür aşırı antibiyotik dozlarına olan ihtiyacı ortadan kaldıran alternatif tedavi metodolojilerinin araştırılması ve geliştirilmesinin acil bir ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Subramanian ve ark., 2020).

1.4. Biyofilmlerin Kantitatif Analizleri

Biyofilmlerde kantitatif analiz için çeşitli doğrudan ve dolaylı yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler zaman zaman tek başına, zaman zaman birlikte kullanılarak uygulanmaktadır.

1.4.1. Doğrudan Sayım Yöntemleri

1.4.1.1. Plakta Sayım

Canlı hücre sayısının hesaplanması temeline dayanmaktadır. Biyofilm tabakası kazıma, vorteksleme veya sonikasyon yoluyla süspansiyon haline getirildikten sonra seri seyreltmelerinin bir agar petrisine belli hacimde ekilmesiyle boya veya cihaz yardımı olmadan canlı hücrelerin ölçümü yapılmaktadır. İnkübasyon süresi sonunda petri plaklarındaki kolonilerin sayılması ile orijinal biyofilm kültüründe mililitre başına hücre sayısı belirlenmektedir (Wilson ve ark., 2017). Hemen hemen tüm laboratuvarlarda uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Buna karşın, biyofilm popülasyonunun sadece kültürü yapılabilen fraksiyonlarını tespit

edebilmesi ve uzun zaman alan bir uygulama olması gibi dezavantajları vardır (Azeredo ve ark., 2017).

1.4.1.2. Akış Temelli Hücre Sayımı

Biyofilmin süspanse ve homojenize olarak sıvı kültür içinde dar geçişlerden akışı ve geçiş esnasında ölçümlerinin yapılması temeline dayanmaktadır. Coulter metodu ve akış sitometrisi bu temele dayanan metotlardır. Coulter yönteminde iletken bir çözelti içinde asılı haldeki yüklü parçacık bir elektrik devresinin parçası olan dar bir açıklıktan geçerken, alternatif akım direncindeki değişimin tespiti yoluyla voltajda meydana gelen değişiklik hücrelerin ayırt edilmesini sağlamaktadır (Mermelstein, 2016; Wilson ve ark., 2017). Akış sitometrisinde ise tamponlanmış bir elektrolit çözeltisi içindeki hücreler dar bir açıklıktan akarken, ekzitasyon optikleri ve toplama optikleri ile algılandıklarında oluşan dijital sinyaller ölçülmektedir (McKinnon, 2018). Hücre boyama veya floresan işaretleme ile hücrelerin yüzey özellikleri, metabolik aktiviteleri ve farklılaşma durumu hakkında bilgi sağlanabilmektedir. Her iki sistem hem yüksek maliyetlidir, hem de birim hacim başına hücre sayısını verememektedir (Wilson ve ark., 2017).

1.4.1.3. Floresan Mikroskobu ile Sayım

Floresan moleküllerini uyararak, belirli uyarım ve emisyon ışığı bantlarına izin veren floresan filtreler ile görüntü alımı prensibine dayanmaktadır. Genç biyofilmlerde hücrelerin tek tek gözlenmesi ve sayımı mümkün olmaktadır. Olgun biyofilmlerde ise üç boyutlu yapı nedeniyle sayım yapmak zorlaşmaktadır ancak toplam yüzey kaplamasını, toplam hacmi ve biyofilm tabakasının derinliğini belirlemeye olanak tanımaktadır (Wilson ve ark, 2017).

1.4.1.4. Konfokal Taramalı Lazer Mikroskobu ile Sayım

Konfokal optikler yardımıyla numunedeki çok küçük hacme odaklanıp, diğer gelen ışığı hariç tutarak görüntü elde etme temeline dayanmaktadır. Biyofilmlerin üç boyutlu ve yüksek çözünürlükte görüntülerle optik ince kesitlerini sunarak biyofilmin derinlik ve genişliğine dair detaylı yapı analizine, aynı anda birden fazla floresan işaretleyiciyle desteklenerek canlı ve ölü hücre ayrımını da görselleştirmeye olanak tanımaktadır (Berger ve ark., 2018; Wilson ve ark., 2017).

1.4.2. Dolaylı Sayım Yöntemleri

1.4.2.1. Kuru Ağırlık Ölçümü

Biyofilm tabakasının kazınarak toplanmasının ardından çöktürme ve kurutma işlemlerine veya kurutulmasını takiben kazındıktan sonra sıvı ortamda çözüp filtreden süzme işlemlerine tabi tutulmasıyla elde edilen, külsüz, tamamen kuru kütlenin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Boulêtreau ve ark., 2006; Chavez-Dozal ve ark., 2016).

1.4.2.2. Total Organik Karbon Ölçümü

Biyofilmdeki karbon miktarının, inorganik karbonun ısıtılmış asitlendirme ile karbondioksite dönüştürülmesi ve bunun kızılötesi spektroskopiyle saptanması yoluyla dolaylı olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Çevresel su kalitesini belirlemek, farmasötik endüstrisinde cihaz temizliğini test etmek ve biyofilm birikim miktarını belirlemek için kullanılmaktadır. Ancak yaklaşık bir değer sunduğu için, doğrudan analiz yöntemlerinden biri ile desteklenmesi gerekmektedir (Wilson ve ark., 2017).

1.4.2.3. Kristal Viyole ile Boyanma

Bu yöntem mikrobiyolojide sıkça kullanılan bazik bir trianilin boyası olan kristal viyole ile boyama ve boyanan kütle yoğunluğunun spektroskopi yoluyla belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Wilson ve ark., 2017). Bakterilerin biyofilm oluşturma yetisininin araştırılması ve antibiyofilm özellikteki maddelerin etkinliklerinin test edilmesi için uygulanmaktadır (Kragh ve ark., 2019). Bu amaçla çeşitli sıvı besiyerlerinde bilinen bir başlangıç konsantrasyonu ile üretilen mikroorganizmanın haznenin cidarında ve hava-sıvı arayüzünde oluşturduğu film tabakası, kültür sıvısından arındırıldıktan sonra belirli oranda seyreltik kristal viyole çözeltisi ile muamele edilmektedir. Ardından boya artıklarından arındırılmış olan tabaka etanol, aseton veya asetik asit gibi bir çözücü ile çözüldükten sonra, bu sıvının absorbans değeri ölçülmektedir (Kragh ve ark., 2019; Wilson ve ark., 2017).

1.4.2.4. Tetrazolyum Tuzlarıyla Boyanma

Pozitif yüklü tetrazolyum tuzlarının biyofilm içindeki canlı hücrelere nüfuz etmesinin ardından, bu hücrelerin ürettiği bazı metabolitlerle floresan özellikteki formazan molekülüne indirgenmesi sonucu spektroskopi yoluyla görselleştirilmesi temeline dayanmaktadır. Biyofilm tetrazolyum tuzu ile birkaç saat bekletildikten sonra formazan indirgenmesi gerçekleşmektedir. Suda çözünen formazanlar direkt spektroskopi ile tespit edilebilirken, suda çözünmeyen formazan hücre zarı içinde hapsolduğundan kantifikasyonu bir çözücü içinde çözüldükten sonra akış sitometrisi ve mikroskopi yoluyla hücre başına değer olarak belirlenebilmektedir (Stockert ve ark., 2018; Wilson ve ark., 2017).

1.4.2.5. Adenozin trifosfat (ATP) ile Biyolüminesans

Hücre canlılığının ana göstergesi, hücre içi adenozintrifosfat (ATP) içeriğidir. Canlı mikroorganizma hücrelerindeki ATP içeriği kuru biyokütlenin gramı başına

500 ila 10.000 μg arasında değişen yüksek değerlerde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hücre içi ATP konsantrasyonunu ölçerek bir numunedeki canlı hücre sayısını tahmin etmek mümkün olmaktadır. Bu yöntemde organik bir substrat olan lusiferin, ATP ve magnezyum iyonlarının varlığında oksijenle hızla oksilusiferine oksitlenmekte ve uygun reaktifin sağlanmasıyla bu esnada oluşan biyolümineans lüminometrik olarak ölçülülmektedir (Lomakina ve ark., 2015).

1.4.2.6. Total Protein Hesaplanması

Protein içeriğinin biyofilmdeki hücre sayısı ile ilişkilendirilmesi prensibine dayanmaktadır. Bir süspansiyon içinde homojen hale getirilen biyofilmdeki hücreler parçalandıktan sonra protein içeriği, bir UV-Vis spektrometresi aracılığıyla ölçülmektedir. Farklı boyalar veya ayraçlardan yararlanılan versiyonları olan bu yöntemin temelinde protein uygun bir reaktif ile karıştırıldığında meydana gelen spektral kaymanın absorbans değeri cinsinden ölçümü yapılmaktadır. Ancak bu yöntem uygulanırken bakteri türü, biyofilmin evresi ve kültür koşulları protein üretiminde farklılığa neden olacağından hücre sayısı ile doğrudan korelasyondan sapmaya neden olabilmektedir. Doğrudan sayım yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir (Wilson ve ark., 2017).

1.4.2.7. Kuvars Kristal Mikrobalans

Kuvars kristal mikrobalans cihazı hedef analitlerin kütlesini elektrik sinyaline dönüştüren ve zamanın fonksiyonu cinsinden biyofilm ölçümüne olanak tanıyan bir biyosensör cihazıdır. Bir biyolojk reaktörün akış kanalı içine yerleştirilmiş altın veya silikon oksit ile kaplanmış diskin substrat görevi gördüğü sistem üzerinde ölçüm yapılmaktadır. Sensör, bir çift elektrot arasında piezoelektrik denen dalga sinyali oluşturan kuvars kristali diliminden oluşmaktadır. Disk yüzeyindeki biyofilm tabakasının kütlesiyle neden olduğu rezonans frekansındaki değişim bu ölçüme olanak tanımaktadır. Rezonatör, kuvars kristal diskin kesme açısına bağlı olan

akustik dalgayı temel almaktadır. Biyofilmin kalınlığı, kayma gerilimi ve viskozitesi hakkında fikir veren bir sistemdir. Gerçek zamanlı kütle birikimini ng/cm^2 doğruluğunda ölçebilmesinin sistemin en büyük avantajı olduğu ifade edilmektedir (Saad ve ark., 2014; Wilson ve ark., 2017).

1.5. Biyofilmleri Kalitatif Görselleştirme Yöntemleri

Biyofilm popülasyonunda yüzde olarak anlamlı bir miktarsal analiz sunmayan, biyofilmin varlığını gösteren ve yapısına dair fikir veren çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin çoğu hücre bileşenlerinin gözlemlenebildiği taramalı elektron mikroskobisi; pürüzlülük, topografya ve sertlik gibi özelliklere dair fikir veren atomsal kuvvet mikroskobisi; biyofilm yapısı ile hücreler arası iletişime dair bilgiler sunan kızılötesi spektroskopisi ve raman spektroskopisi; EPS bileşenlerini, yapısını ve potansiyel olarak moleküler etkileşimleri incelemeye olanak tanıyan dar açılı x-ışını saçılımı; bakteri fizyolojisi ve elektrokimyasal aktiviteyi gerçek zamanlı olarak etiketsiz incelemek için kullanılan yüzey plazmon rezonans spektroskopisi ve elektrokimyasal yüzey plazmon rezonansı gibi mikroskobik yöntemlerdir. Kongo kırmızısı agar metodu ise katı besiortamında üretilen mikroorganizmalarda biyofilm oluşturan örneklerin siyahi, oluşturmayan örneklerin kırmızı renkte ekzopolisakkarit üretmesiyle boyar madde ile ölçüm temeline dayanmaktadır. (Wilson ve ark., 2017).

1.6. Karma-tür Biyofilmler

1.6.1. Karma-tür Biyofilmlerde Etkileşimler

Biyofilm biyolojisine dair elde edilen çok sayıdaki veriye rağmen, yapısı ve işlevi hakkındaki bilgilerde önemli boşluklar mevcuttur. Her bir hücrenin ayrı bir organizmayı temsil ettiği bir topluluk olarak mı, hücrelerin bir organizmanın parçası olduğu çok hücreli biyolojik bireyler olarak mı değerlendirilmesi gerektiği konusu hala tartışılmaktadır (Penesyan ve ark., 2021). Bakterilerde biyofilm oluşumunun

temelinde çok hücreli davranışın yattığı fikrinin alevlendiği günümüzde, omik veriler ışığında evrimsel açıdan daha genç ve daha ırak genlerin biyofilmin ileri zaman noktalarına doğru giderek daha fazla ifade edildiği ve ökaryotik embriyoların sahip olduğu şekilde ayrı ontogenetik aşamalarda organize edildiği gösterilmiştir (Futo ve ark., 2021).

Bazı mikroorganizmalar kendi sinyallerini üretmek için enerji harcamak zorunda kalmadan, diğerleri tarafından üretilen sinyalleri dinleyerek bazı görevleri yerine getirebilmekte ve çevresel değişikliklere tepki verebilmektedir (Little ve ark., 2021). Mikroorganizmalar hem rekabete hem de işbirliğine dahil olan türler arası sinyalizasyon sistemlerinin yanı sıra, konakları ile etkileşim için ek sinyal algılama stratejileri geliştirmiştir (Barrasso ve ark., 2020). Ayrıca, sinyal sistemleri klasik algılama aracılı transkripsiyonel değişikliklerden daha farklı mekanizmalarla komşu mikroorganizmaların antimikrobiyal duyarlılığını değiştirebilmektedir (Orazi ve O'Toole, 2019). Örneğin karma-tür biyofilm içinde *Candida albicans* ürettiği sinyal molekülü farnesol ile *S. aureus*'u vankomisinden korumaktadır (Kong ve ark., 2017). *P. aeruginosa*'da LasA endopeptidaz vankomisinin *S. aureus*'u parçalanmasını güçlendirmekte, ramnolipidler proton-hareket gücünden bağımsız tobramisin alımını kolaylaştırmakta ve 2-heptil-4-hidroksikinolin N-oksit *S. aureus*'ta çoklu ilaç toleransını indüklemektedir (Radlinski ve ark., 2017).

Türler arasındaki evrimsel uyumun gücü, her birinin kaç seçeneği koruduğuna bağlıdır. Metabolik entegrasyon, ilgili kaynağın yalnızca bir sağlayıcısı olduğunda evrimsel bireysellikten uzaklaşmaktadır. Bazı türlerin sadece ortak kültürdeyken başarılı bir şekilde kültürlenirken, metagenomik yöntemlerle tanımlanabilen birçok türün henüz başarılı bir şekilde kültüre edilememesi, hayatta kalmalarının diğer türlerin metabolitlerine bağlı olması ihtimalini işaret etmektedir (Clarke, 2016). Karma-tür biyofilmlerde gerek tür gerekse ortam koşullarındaki çeşitlilik nedeniyle işbirliği ve rekabet dinamiğinin değişkenliği bu tür biyofilmlerin mekanizmasının aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır.

1.6.2. Karma-tür Biyofilmlerle İlişkili Enfeksiyonlar

Biyofimlerin implantlar ve kateterler gibi tıbbi cihazlarda, solunum yolu mukozasında ve dişlerde oluşan enfeksiyonların birincil nedeni olduğu, tüm bakteriyel enfeksiyonların ise % 65'inin biyofilmleri içerdiği düşünülmektedir (Subramanian ve ark., 2020). Karma-tür biyofilmler işitsel organ, kardiyovasküler sistem, örtü tabaka, sindirim kanalı, üreme sistemi gibi çok çeşitli vücut bölgelerinde enfeksiyona neden olmaktadır. Karma-tür biyofilmlerin bakterilerin tesadüfi agregasyonu sonucu oluşmadığı, gereksinimlerle şekillendiği düşünülmektedir (Percival ve ark., 2018).

Karma-tür biyofilmlerin neden oldukları enfeksiyon seyir tablosunun tek türden oluşan biyofilmlere göre daha kötü ilerlediğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Örneğin farelerin deri altı apselerinde karışık aerobik, fakültatif ve anaerobik kültürlerin kombinasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada aerobik mikroorganizmalar Bacteroides türleri ile birlikteyken ve Gram-pozitif anaeroblar *P. aeruginosa* veya *S. aureus* ile birlikteyken mortalitede önemli bir artış olduğu keşfedilmiştir (Brook ve ark., 1984). *P. aeruginosa* ve *S. aureus* ile koenfekte olan kistik fibrozis hastalarında, pulmoner fonksiyonda azalma, alevlenme ve mortalite tabloları daha kötü seyretmektedir (Hubert ve ark., 2013; Limoli ve ark., 2016). Dental biyofilmlerde birlikte tutulumu gözlenen *Streptococcus mutans* ve *C. albicans* karma-tür biyofilminde tek tür biyofilm oluşumlarına kıyasla biyokütle, protein miktarı ve çevresel strese direnç artmaktadır (Lobo ve ark., 2019). *S. mutans* ve *Actinomyces naeslundii* karma-tür biyofilminde laktik asit üretiminde azalma sonucu klorheksidin maruziyetine karşı direnç artmaktadır (De Oliveira ve ark., 2020).

Teknolojideki gelişmeler mikrobiyolojik tanı sahasına adapte edildikçe biyofilm kaynaklı enfeksiyonların pek çoğunun birden fazla türü içeren karmaşık yapıları gün yüzüne çıkmaktadır.

1.6.2.1. Dental Enfeksiyonlar

Diş çürükleri mikroorganizmalar, mikrobiyal ürünler, tükürük ve şeker gibi bir diyet ürününün diş yüzeyindeki etkileşimleri sonucu oluşan, dünya çapında yaygın ve maliyetli biyofilm ilişkili enfeksiyonlardan biridir (Koo ve Bowen, 2014). Bugüne değin 700'den fazla bakteri türünün tespit edildiği oral kavitede gelişen olgun bir dental biyofilm, 100'e kadar farklı mikrobiyal tür içerebilmektedir (Larsen ve Fiehn, 2017). Dental çürüklerden izole edilen bakteriler arasında bazı *Enterococcus spp.* ve *Klebsiella spp.* de yer almaktadır (Bansal ve ark., 2020). Dental biyofilmlerde karma-tür etkileşimler üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur. *Streptococcus gordonii* ve *Veillonella atypica*'nın, *Porphyromonas gingivalis* ve *S. gordonii*'nin, *Fusobacterium nucleatum* ve *P. gingivalis*'in, *S. gordonii* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ın metabolik faaliyetler bakımından sinerjik etkileşim ile birbirini tamamladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Diaz ve Valm, 2020). Çalışmaların kültürü kolay yapılabilen türler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. *S. mutans* ve *C. albicans* karma-tür biyofilminde *C.albicans*'ın karbondidrat metabolizması, hücre morfogenezi ve hücre duvar bileşenleri ile ilişkili genlerin ve proteinlerin ekspresyonunun belirgin oranda arttığı gösterilmiştir (Ellepola ve ark., 2019). Son yıllarda dental biyofilmlerde yer alan mikroorganizmaların oral kanser ile ilişkisini araştıran çalışmalar artmaktadır. *A. naeslundii*, *C. albicans* ve *S. mutans* karma-tür biyofilmi üzerinde yapılan bir çalışmada ise biyofilmden salınan metabolitlerin, oral malign epitel hücrelerin ekstraselüler matris moleküllerine yapışmasını destekleyerek alttaki bağ dokuyu istila etmelerini sağladığı belirtilmiştir (Arzmi ve ark., 2019). Antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri olan dental restoratif/protez materyallerin geliştirilmesi amacıyla yürütülen günümüz çalışmalarında tek tür veya karma-tür biyofilmlerin bu materyallerin yüzeyleriyle etkileşimleri, kültür ortamı ve sirkadyan ritim gibi parametreler göz önünde bulundurularak değerlendirilmektedir (Kohno ve ark., 2021).

1.6.2.2. Alzaymır

Alzaymır hastalığı hafıza ve düşünme becerilerini yok eden ilerleyici bir beyin deformasyonudur. Amiloid-β peptidinin aşırı üretimi ve birikmesinin yanı sıra, tau proteininin hiperfosforilasyonu ile ilişkilidir. Alzaymır hastalarının beyin dokularından *Treponema pallidum* (Noguchi ve Moore, 1913) ve *Borrelia burgdorferi* (MacDonald ve Miranda, 1987) bakterilerinin izolasyonu uzun yıllar öncesine dayanmaktadır. Zamanla kronik spiroketal enfeksiyonun geç nörosifilizde yavaş ilerleyen demans, beyin atrofisi ve amiloid birikimine neden olabileceği tespit edilmiştir (Miklossy, 2011). Bağışıklık sisteminin hem bakteriyel amiloidleri, hem de insan amiloidlerini aynı reseptörler aracılığıyla tanıdığı gösterilmiştir (Tukel ve ark., 2009). Amiloid-β peptidinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunun keşfedilmesiyle, amiloid-β plak oluşumunun enfeksiyon tarafından indüklenebileceği düşünülmüştür. Günümüzde, farklı cinslerden hatta farklı taksonlardan türlerin karma-tür biyofilmleri ve ilişkili enfeksiyon tablosuyla mücadele yöntemleri araştırılmaktadır (Vigasova ve ark., 2021). Bir hipoteze göre bakteriyel sinyaller ve metabolitler, hem aferent hem de eferent sinirleri içeren ve enterik sinir sistemini beyin sapına bağlayan vagus siniri üzerinden beyne ulaşmaktadır. Böylece amiloidojenik proteinlerin kümelenmesinin bağırsak bakterilerinden köken alabileceği ya da bu yolla indüklenebileceği düşünülmektedir (Miller ve ark., 2021).

1.6.2.3. Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis, transepitelyal klorür taşıyıcısını kodlayan genin mutasyonundan kaynaklanan ölümcül otozomal resesif bir genetik hastalıktır. Çoklu organ hastalığı olmasına rağmen, solunum komplikasyonları önemli morbidite ve mortalite kaynağıdır. Muko-siliyer klirens üzerindeki etkisi, bikarbonat atılımının bozulması bakterilerin üremesi için elverişli bir ortam yaratmaktadır (Castellani ve Assael, 2017). Akciğer fizyolojisindeki değişiklikler kronik enfeksiyonların oluşumuna neden olabilmektedir. *P. aeruginosa, S. aureus, Haemophilus influenzae* ve *Burkholderia cepacia* kompleks başta olmak üzere çeşitli bakteri, virüs ve mantar

enfeksiyonda rol almaktadır (Khanolkar ve ark., 2020). En çok çalışılan kistik fibrozis akciğer patojenlerinden *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un birlikte kolonize olmalarının solunum fonksiyonuna olumsuz yönde etki ettiği ve metabolik etkileşimler yoluyla antimikrobiyal etkinliği değiştirdiği gösterilmiştir (Jean-Pierre ve ark., 2021).

1.6.2.4. Kronik Bağırsak Yaraları ve Kolorektal Kanser

İnsan kolorektal kanseri, dünya çapında en yaygın üçüncü kanserdir. Çeşitli risk faktörleri arasında, kolon mikrobiyotasının önemi dikkat çekmektedir (Mirzaei ve ark., 2020). Mikroorganizmaların inflamatuar bağırsak hastalığı gibi malign olmayan olgularda, kronik bağırsak yaralarında ve kolon kanserindeki rolü yakın zaman çalışmaları ile gün yüzüne çıkmaktadır (Mirzaei ve ark., 2020; Tytgat ve ark., 2019). *Bacteroides fragilis* inflamatuar bağırsak hastalığında, *Eubacterium rectale* ve *B. fragilis* kolitte, *E. rectale* ve *Clostridium coccoides* irritabl bağırsak sendromlu hastaların biyofilmlerinde baskındır. Mukus bağlayıcı biyofilmler hastalık patogenezinde ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Bai ve ark., 2019). Ailesel adenomatöz polipozis hikâyesi olup, iyi huylu öncü lezyonlar geliştiren hastaların kolon mukozasında, ağırlıklı olarak onkotoksin özellikteki metabolitlerden kolibaktini salgılayan *E. coli* ve toksin bft'yi salgılayan *B. fragilis* içeren bakteriyel biyofilmlerin gözlenmesi sonrası fareler üzerinde yürütülen deneyde her iki bakteri türünün tek başına kullanıldığı farelere kıyasla, daha hızlı tümör başlangıcı ve daha yüksek ölüm oranı tespit edilmiştir. Böylece kolorektal kanser ile tümörijenik bakteriler arasındaki bağıntı ortaya çıkarılmıştır (Dejea ve ark., 2018). İki türün birlikte varlığının taranmasının, kanser riskinin değerlendirilmesine fayda sağlayacağı düşünülmektedir (Tomkovich ve Jobin, 2018). Potansiyel patojenler içeren karma-tür biyofilmler, erken uyarı sinyali veren biyobelirteçler olarak umut vaat etmektedir (Tytgat ve ark., 2019).

1.6.2.5. Otitis Media

Otitis media, pediyatrik dönemin önde gelen hastalıkları arasındadır ve epidemiyolojik veriler, kronik enfeksiyonların çoğunun karma-tür olduğunu göstermektedir. *S. pneumoniae, H. influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* gibi nazofarenks içinde bulunan fırsatçılardan kaynaklanmaktadır. *Actinomyces spp*., *Veillonella spp*., *Rothia spp.* ve *Neisseria spp.* varlığı da rapor edilmiştir (Armbruster ve ark., 2010; Laufer ve ark., 2011). Kronik ve tekrarlayan vakalardan alınan örneklerde *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*'in sıklıkla birlikte bulunması karma-tür biyofilm içinde bakteriyel kalıcılığı içerdiğini düşündürmektedir (Armbruster ve ark., 2010). Otitis media enfeksiyonlarında karma-tür biyofilmlerin tedaviyi zorlaştırdığı ve yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Bair ve ark., 2020).

1.6.2.6. Diyabet Kökenli Yara Enfeksiyonları

Diyabetik hastalarda hiperglisemiye bağlı nöropati, sinir hasarı, periferik vasküler hastalıklar ve cilde zarar verebilecek travmalar kronik yaraların gelişimine neden olmaktadır. Diyabet kökenli ayak yaraları mikroorganizmalar için sıcak, nemli ve besince zengin bir ortam sağlamaktadır. Enfekte ve iyileşmeyen tip yaralarda biyofilm varlığının çok yaygın olduğu belirtilmektedir. Kronik ayak yarası vakalarının bir kısmında alt ekstremite amputasyonu gerekmektedir. Yaralara yerleşen çeşitli mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas spp., E. coli, S. aureus, Streptococcus pyogenes, Klebsiella spp., Acinetobacter spp., Proteus mirabilis, Citrobacter spp.* ve *Enterococcus spp.* yer almaktadır. Aralarında *S. aureus* en sık rastlanan türdür. Karma-tür tutulumlarda β-hemolitik streptokoklar, *E. coli, Klebsiella spp*. ve *P. aeruginosa* ile de karşılaşılmaktadır (Buch ve ark., 2019; Percival ve ark., 2018).

1.6.2.7. Endokardit

Endokardit nispeten seyrek görülen bir enfeksiyon hastalığı olmakla birlikte, ciddi morbidite nedenidir ve mortalite oranı yaklaşık %25'tir (Ambrosioni ve ark., 2017). Endokardit vakalarında sıklıkla Gram-pozitif bakteriler izole edilmektedir. Ancak bir pulmonik kapak endokarditi olgusunda karma-tür biyofilm ajanı olarak *Klebsiella spp.* ve *Citrobacter spp.* varlığı da gösterilmiştir (Bekker ve ark., 2019). Karma-tür endokardit vakalarının araştırıldığı bir başka çalışmada koagülaz negatif Stafilokoklarla Enterokokların, Gram-negatif basillerin ya da *Streptococcus viridans*'ın bir arada izole edildiği rapor edilmiştir (García-Granja ve ark., 2015). Bir başka çalışma ise *Candida parapsilosis* ve *P. aeruginosa* ilişkili enfeksiyonun çizdiği ağır tabloya işaret ederek, kan kültüründe türlerden biri teşhis edilmiş olsa da karma-tür tutulumun göz önünde bulundurulması gerektiğini belirtmektedir (Kaur ve ark., 2021).

1.6.2.8. Tıbbi Cihaz Kullanımıyla İlişkili Enfeksiyonlar

Mikroorganizmalar kalıcı veya geçici olarak vücuda yerleştirilen bir tıbbi cihaza tutunduğunda tıbbi cihazlarla ilişkili biyofilm enfeksiyonları ortaya çıkmaktadır. Bir tıbbi cihazın yüzeyinde, cihazla temas halindeki vücut sıvılarındaki organik maddenin bir kısmının taban tabakası şeklinde birikmesini takiben yeterli besin ve su varlığında yüzeye mikroorganizma tutulumu gerçekleşmektedir (Roberts, 2013).

Endotrakeal tüpler, idrar sondaları, iğnesiz konektörler, kateterler, kalp pilleri, kontakt lensler, mekanik kalp kapakçıkları, protez eklemler, rahim içi cihazlar, ses protezleri ve timpanostomi tüpleri gibi çeşitli tıbbi cihazlarda bu oluşum gözlenmektedir. Hastanın kendi florasından, sağlık çalışanından veya diğer kaynaklardan *E. faecalis, S. aureus, S. epidermidis, viridans Streptokok, E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis* ve *P. aeruginosa* başta olmak üzere çeşitli bakteriler cihaza

veya kullanım süresine bağlı olarak tek tür veya karma-tür olarak izole edilmektedir (Donlan, 2001).

En sık karşılaşılan tıbbi cihaz ilişkili enfeksiyonlar dolaşım ilişkili septisemi, ventilatör ilişkili pnömoni ve kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarıdır (Percival ve ark., 2015).

1.6.2.8.1. Dolaşım İlişkili Septisemi

Dolaşım ilişkili enfeksiyonların gelişimi, normalde steril bir ortam olan kanda bakteri veya mantar varlığı ile ilgilidir. Bu mikroorganizmalar kan dolaşımına katıldıklarında hematojen yayılmayla endokardit, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, menenjit, osteomiyelit, protez enfeksiyonları gibi lokalize enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Pinto ve ark., 2021). En sık rastlanan etkenleri arasında *S. aureus, E. coli, K. pneuomoniae, P. aeruginosa, E. faecalis, S. epidermidis, Enterobacter cloacae, S. pneumoniae, Enterococus faecium* ve *A. baumannii* yer almaktadır (Diekema ve ark., 2019).

1.6.2.8.2. Ventilatör İlişkili Pnömoni

Ventilatörle ilişkili pnömoni, özellikle trakeal entübasyondan sonra 48 saatten fazla mekanik olarak ventile edilen hastalarda meydana gelen; akciğer infiltrasyonu, ateş, akyuvar ve balgam özelliklerinde değişiklikler ve etken ajan/ajanlar varlığı ile karakterize bir enfeksiyondur (Baidya ve ark., 2021). Ventilasyon uygulanan hastaların endotrakeal tüpünde biyofilm oluşumu enfeksiyonun gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Gil-Perotin ve ark., 2012). Bu tip bir enfeksiyonun erken dönemlerinde *Streptococcus pneumoniae, H. influenzae*, metisiline duyarlı *S. aureus* sık rastlanan türlerken; geç dönemlerinde metisiline dirençli *S. aureus, A. baumannii* ve *P. aeruginosa* göze çarpmaktadır (Hunter, 2012).

1.6.2.8.3. Kateter İlişkili Üriner Sistem Enfeksiyonları

Tıbbi cihaz kullanımıyla ilişkili hastane kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık % 40'ını üriner sistem efeksiyonları oluşturmaktadır. Söz konusu enfeksiyonların % 80'i ise KİÜSE'dir (Mota ve Oliveira, 2019; Tenke ve ark., 2008). Dört haftadan uzun süre kateterize edilen hastaların neredeyse tamamında bakteriüri görülmekte ve bu bakteriler sınırlı sıvı alımı, uygun olmayan torba yerleşimi veya yetersiz torba drenajı gibi nedenlerle kateter yüzeyine tutunduklarında antibiyotiklere veya sıvı akışına karşı duyarlılığı azalmış biyofilmler geliştirebilmekte, kateterizasyon süresi uzadıkça gelişen biyofilmin etkisiyle enfeksiyon semptomları ortaya çıkmaktadır (Gaston ve ark., 2020; Hou ve ark., 2022). Kateterizasyon ile indüklenen bağışıklık tepkisini takiben üriner kateterlerin yüzeyinde fibrinojen birikmesi ve idrar akışından besinlerin sürekli temini vasıtasıyla mikroorganizmanın kolayca kolonizasyonu, in-vitro biyofilm oluşturma kapasitesi daha düşük olan bakterilerin kateterlerde biyofilm oluşturmasına katkı sağlamaktadır (Pinto ve ark., 2021). Ayrıca, kateter replasmanından sonra da enfeksiyon nüksü gözlenmektedir (Gaston ve ark., 2020).

Hastane ortamında uzun süre kateterize olan hastalarda vakaların çoğu karma-türdür ve KİÜSE vakalarında iki ila 6 tür gözlenebilmektedir. Son 20 yılda, KİÜSE vakalarında en sık karışan patojenler *E. coli, P. aeruginosa, Klebsiella spp., Enterococcus spp.* ve *Proteus mirabilis*'tir (Hou ve ark., 2022). Erken kolonizasyonda *E. coli, Enterococcus spp., P. aeruginosa*, koagülaz negatif *Staphylococcus spp., Klebsiella spp.* ve *Enterobacter spp.* sık rastlanan türlerken; daha uzun vadede *Enterococcus spp., E. coli, P. aeruginosa, P. mirabilis, Providencia spp.* ve *Morganella morganii*'ye rastlanmaktadır (Gaston ve ark., 2020).

Enfeksiyon riskinin önüne geçmek için kateterlerde gümüş, antibiyotik, enzim, bakteriyofaj, antimikrobiyal peptit, karbon nanotüp, grafen oksit gibi antimikrobiyaller ya da polietilen glikol, hidrojel, polizvitterion, katyonik polimer, nitrik oksit, iyi huylu bakteri gibi malzemelerle kaplama yöntemleri denenmektedir (Zhu ve ark., 2019). Bu tip stratejilerden verimli sonuçlar alınamamasının bir

nedeninin monomikrobiyal gelişim için değerlendirilmeleri olduğu düşünülmektedir (Hou ve ark., 2022).

1.6.3. Karma-tür Biyofilm İlişkili Enfeksiyonların Tedavisi

Mevcut antimikrobiyal ajanlar karma-tür enfeksiyonların tedavisinde etkili olmaktadır ancak çoklu ilaca dirençli (ÇİD) patojenlerin yaygınlaşmasının ve antimikrobiyal ajanların dağıtımı için seçeneklerin sınırlı olmasının, önümüzdeki yıllarda karma-tür enfeksiyonlarla mücadeleyi ciddi şekilde etkilemesi beklenmektedir. Hem yeni antimikrobiyal ajanlar, hem de enfekte olmuş bölgeleri hedefleyen yeni formülasyonlar veya dağıtım sistemlerine acil ihtiyaç duyulmaktadır (Sartini ve ark., 2021). Ayrıca, yeni tedavi metotlarına odaklanmanın yanı sıra, antibiyotiklerle biyofilmlerin etkileşimlerine dair temel bilgilerdeki eksikler de göz önünde bulundurulmalıdır. Mikroskobik incelemeleri kimyasal profilleme ile birleştirebilen, biyofilm ortamını algılayabilen ve omik veriler gibi karmaşık veri setlerini işleyebilen tekniklerin birlikte kullanımı gerekmektedir (Coenye ve ark., 2020). Kronik enfeksiyonların genellikle biyofilm ilişkili karma-tür enfeksiyonlar olduğu görüşünün yaygınlaşmasıyla paralel olarak, türler arasındaki sinerjizm göz ardı edilmeden, klinikte karma-tür enfeksiyonlarda antimikrobiyal duyarlılığı belirleyen yeni sistemlere duyulan ihtiyaç da dile getirilmektedir (Little ve ark., 2021).

1.6.3.1. Antibiyotikler

Bakteriyel enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede ilk sırada yer alan antibiyotik kullanımı biyofilm ilişkili enfeksiyonlar için de ilk seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Potansiyel enfeksiyon bölgesine mikroorganizmadan önce antibiyotiğin penetre olması yoluya biyofilm gelişim riskini azaltmak için profilaktik kullanımdan, bilinen kültür ve duyarlılık testi sonuçlarına dayalı kesin tedavi için kullanıma kadar çeşitli uygulamalar mevcuttur (Høiby ve ark., 2015). Oysa, antimikrobiyal duyarlılık

test sonuçlarına dayalı bir tedavide, biyofilmlerde rekalsitrans nedeniyle her zaman terapötik başarı mümkün olmamaktadır (Ciofu ve ark., 2017). Üriner kateter kullanımı gibi durumlarda kısa süreli sistemik antibiyotik tedavisi biyofilm enfeksiyonlarını 1-2 hafta erteleyebilmektedir, ancak süperenfeksiyon endişesi nedeniyle önerilmemektedir (Høiby ve ark., 2015). Bu gibi durumların üstesinden gelmek için mümkün olduğunda yüksek lokal konsantrasyon sağlayacak topikal uygulamalar gibi çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Kistik fibroz hastalarına inhalasyon yoluyla aztreonam, gentamisin, kolistin, levofloksasin, siprofloksasin veya tobramisin uygulaması; endotrekeal tüplerde inhalasyonla vankomisin ya da gentamisin uygulaması; yara enfeksiyonlarında kütanöz olarak mupirosin veya metronidazol uygulaması; kateterlerde lümen içine minosiklin, linezolid, vankomisin, sefazolin, daptomisin, tigesiklin, rifampisin, seftazidim yada siprofloksasin uygulaması bu duruma örnek uygulamalar arasında yer almaktadır (Ciofu ve ark., 2017). Yakın dönemde KİÜSE hastalarından izole edilen bakterilerde ampisilin, gentamisin, sefazolin, sefotaksim, seftazidim, siprofloksasin direncinin yaygın olduğu görülmektedir (Bagali ve Mantur, 2021; İgan ve Hancı, 2022; Maharjan ve ark., 2018; Tomar ve ark., 2017).

KİÜSE enfeksiyonları ile daha etkili mücadele için yeni anti-inflamatuar veya virülans önleyici ajanların tespit edilmesi ve antibiyotiklerle kombine kullanımları önerilmektedir (Høiby ve ark., 2015).

1.6.3.2. Aşılar

Biyofilmlerle mücadelede en güncel yaklaşımlardan biri aşılardır. Türe özgü veya pek çok tür için ortak antijenik yapıları hedef alan aşılar üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Tıbbi implantların kullanımında genel bağışıklamanın, kontamine cihazların çıkarılması ve değiştirilmesinden daha uygun maliyetli olduğu düşünülmektedir (Mirzaei ve ark., 2021). *E. faecalis*'in pilus ucunda bulunan ve fibrinojenle etkileşimine aracılık ederek biyofilm oluşumunda rol alan EbpA ile aşılanan farelerde, KİÜSE'ye karşı koruma sağlanmıştır (Flores-Mireles ve ark.,

2014). Bütünlüğü bozulmamış immünoglobulin G molekülleri yerine, Fab kısımlarını hedefleyen tasarımların kullanımının, tekrarlanan tedavilerin gerekli olduğu durumlarda anti-antikorların oluşumunu önleyebileceği belirtilmektedir (D'Andrea ve Lau, 2020). Aşıların etkinliğini artırmak için patojen üzerinde birden fazla hedefe karşı bağışıklık tepkisini indükleyebilecek multivlan aşılara duyulan ihtiyaç vurgulanmaktadır (Antonelli ve ark., 2021).

1.6.3.3. Yüzey Kaplamaları

Mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını önlemek için bu yüzeyleri antimikrobiyal özellikteki maddelerle kaplama çalışmaları yürütülmektedir. Bu yöntemi aktif ve pasif stratejiler olarak iki grupta toplamak mümkündür. Yüzeyin hidrofobisitesi, topografisi, pürüzlülüğü, sertliği ve elektrik yükü pasif stratejileri oluştururken; ilaç salınımlı sistemler, temasla öldürmeye dayanan sistemler ve hem salınım hem de temas bazlı sistemler ise aktif stratejilerdir (Balaure ve Grumezescu, 2020). Süperhidrofobik yüzey tasarlama çalışmalarında bazı bitki yaprakları, sinek gözü, kelebek kanadı ve köpekbalığı derisi gibi doğada var olan yapılar taklit edilmeye çalışılmaktadır. Fibrinojen, fibronektin gibi proteinlere tutunmayı önlemek için peptit temelli kaplamalar ele alınmaktadır. Nitrik oksit ya da gümüş gibi maddeler içeren salınımlı kaplamalar mikrobisidal etki göstermektedir. Güncel yaklaşımlar çevre dostu yüzey kaplamalarını işaret etmektedir (Huang ve ark., 2020).

1.6.3.4. Probiyotikler

Biyofilmlerle mücadelede bir diğer stratejik yaklaşım probiyotik kullanımıdır. İnflamatuar bağırsak hastalığı ilişkili biyofilmler üzerinde probiyotiklerin etkisi araştırılmaktadır. Hazırlanan bir probiyotik kokteylinin silikon elastomer diskler üzerinde gelişen karma-tür biyofilm matrisini ve kalınlığını azalttığı, kandidal hif oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Hager ve ark., 2019). *Lactobacillus salivarius*

içeren bir probiyotiğin, *C. albicans* - *S. mutans* karma-tür biyofilminde kandidal hif oluşumunu engellediği, biyofilm kütlesini azalttığı gösterilmiştir (Krzyściak ve ark., 2017). Potansiyel probiyotik *Pediococcus acidilactici*'nin laktik asit üretimi ile *P. aeruginosa*'da biyofilm inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Kiymaci ve ark., 2018).

1.6.3.5. Faj Terapisi

Faj terapisi biyofilm tedavisinde umut vaad eden bir yöntem olarak görülmektedir. Faj temelli tedaviler temelde konakçıyı ortadan kaldıran litik faj kullanımı, fajların antibiyotiklerle kombine edilerek uygulanması ve fajlardan türetilen lizinler ya da depolimerazlar gibi enzibiyotiklerin kullanılması gibi yollarla uygulanmaktadır (Ferriol-González ve Domingo-Calap, 2020). *S. aureus*'un *Lactobacillus plantarum*, *E. faecium* veya *Lactobacillus pentosus* ile oluşturduğu karma-tür biyofilmler stafilokokal faj phiIPLA-RODI ile muamele edildiğinde, eşlik eden türe ve enfeksiyon koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermiştir (González ve ark., 2017). *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'yı hedef alan AB-SA01 ve AB-PA01 fajlarından oluşan kokteyl bu bakterilerin karma-tür biyofilm kültürlerinde biyofilm kütlesinde azalmaya neden olmuştur (Kifelew ve ark., 2020). Ancak, fajların biyofilmlerle etkileşimleri biyofilmin üç boyutlu yapısına ve fizyolojisine bağlıdır. Faj etkinliğini artırmaya yönelik yaklaşımlar üzerine çalışılmaktadır (Melo ve ark., 2019).

1.6.3.6. Bitki Kökenli Bileşenler

Bitkiler çok eski zamanlardan bu yana enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Alternatif antimikrobiyaller olarak değerlendirilen bitkisel bileşenler arasında alkaloidler, fenoller, flavonoidler, glukozinolatlar, kinonlar, lignanlar, peptitler, tanenler, terpenoidler, uçucu yağlar ve diğer bazı sekonder metabolitler yer almaktadır (Chandra ve ark., 2017). Yakın geçmişte bitkilerden elde

edilen bu sekonder metabolitlerin, özellikle ÇİD bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri ilgi çekmiştir. Ancak, antibiyotiklere kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda etki göstermeleri nedeniyle monoterapide kullanıma uygun olmayıp, antibiyotiklerle kombinasyonlarının etkinliği araştırılmaktadır (Barbieri ve ark., 2017). Bitki kökenli bileşenlerin antibiyofilm etkileri ise hücreler arası iletişim sistemlerini, matriks için gerekli metallerin alımını ve antimikrobiyallere toleranstan sorumlu mekanizmalardan biri olan eflüks pompasını inhibe etmek gibi yollarla gerçekleşmektedir (Borges ve ark., 2016). Bitki kökenli bileşenler arasında kuersetin, kurkumin, ögenol, sinnemaldehit ve timol dikkat çeken bileşenlerdendir. Bu maddelerin antimikrobiyal aktivitelerinin test edildiği çok sayıdaki çalışmanın yanı sıra, son yıllarda aktivite mekanizmalarının aydınlatılmasına ve etkilerini artırmaya yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır.

1.6.3.6.1. Kuersetin

Soğan (*Onion spp.*) bitkisinde bol miktarda bulunan kuersetin (Kwak ve ark., 2017), sudaki çözünürlüğü zayıf (Masri ve ark., 1959), vücutta absorbsiyonu düşük ve metabolizması hızlı olduğundan biyoyararlanımı zayıf bir maddedir (Aluani ve ark., 2016). Buna karşın enfeksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar, tümörler ve bağışıklık sistemi hastalıklarının tedavisinde geniş bir etki yelpazesine sahip olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Costa ve ark., 2016; Patel ve ark., 2018; Yang ve ark., 2020). Kuersetinin etki mekanizmasının araştırıldığı çalışmalarda metisiline dirençli *S. aureus*'un hücre yüzey yapısını bozduğu (Hirai ve ark., 2010); *E. coli*'nin hücre zar yapısını bozmanın yanında, enerji metabolizmasını inhibe ettiği (Dadi ve ark., 2009); *S. pneumoniae*'nin pnömolizin aktivitesini inhibe ettiği ve sitokin toksisitesini nötralize ettiği (Lv ve ark., 2020); *P. gingivalis*'in hücre zar yapısını bozduğu, hücre yüzey hidrofobisitesini artırdığı, hemaglütinasyonunu azalttığı ve biyofilm metabolizmasını azalttığı (He ve ark., 2020) gösterilmiştir.

1.6.3.6.2. Kurkumin

Kurkumin zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinden elde edilen, sudaki zayıf çözünürlüğüne ve düşük biyoyararlanımına rağmen antimikrobiyal potansiyeli kayda değer bulunan bitki kökenli maddeler arasında yer almaktadır (Kotha ve Luthria, 2019; Rahmani ve ark., 2018). Anti-alerjik, anti-dermatofitik, anti-inflamatuar, antidiyabetik, antikanser, antioksidan, hepatoprotektif, kemoprotektif, nöroprotektif, yara iyileştirici özellikleri diğer başlıca etkileridir (Salehi ve ark., 2019). Antibakteriyel etki mekanizmasının araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Kurkuminin *P. aeruginosa* çoğunluğu algılama sistemini baskıladığı (Abdulrahman ve ark., 2020); *E. coli* ve *S. aureus*'ta DNA hasarına neden olduğu (Adeyemi ve ark., 2020); *B. subtilis* FtsZ protein polimerizasyonunu inhibe edebildiği (Kaur ve ark., 2010); sentetik türevlerinden Kurkumin I'in *S. aureus, E. faecalis, E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde doz artışıyla birlikte antibakteriyel etkisinin arttığı ve *S. aureus* ile *E. coli*'nin membran geçirgenliğini artırdığı (Tyagi ve ark., 2015) tespit edilmiştir.

1.6.3.6.3. Ögenol

Ögenol, karanfil (*Syzygium aromaticum)* başta olmak üzere çeşitli bitkilerden elde edilebilen, baharatlı bir aromaya ve yağlı bir kıvama sahip, açık ila soluk sarı renkte fenol grubundan aromatik bir bileşiktir. Karanfil yağının en önemli bileşenidir. Sudaki çözünürlüğü düşüktür, organik çözücülerde iyi çözünmektedir (Marchese ve ark., 2017; Ulanowska ve Olas, 2021). Biyolojik aktiviteleri arasında analjezik, anti-aterojenik, antidiyabetik, antihiperkolesterolemik, anti-inflamatuar, antikanser , antimikrobiyal, anti-oksidan ve nöroprotektif etkiler yer almaktadır (Nisar ve ark., 2021; Ulanowska ve Olas, 2021). Antimikrobiyal etkisi üzerinde çok sayıda çalışma yürütülmüştür. *Vibrio parahaemolyticus* hareket kabiliyetini engellediği, hücre membran bütünlüğünü bozarak zar geçirgenliğini artırdığı, biyofilm kapasitesini azalttığı, çoğunluğu algılama sistemini inhibe ettiği (Ashrafudoulla ve ark., 2020); *E. coli* hücre zarı bütünlüğünü bozarak üreme kapasitesini azalttığı (Jeyakumar ve Lawrence, 2021); gıda ürünlerinde bozulmaya

neden olan laktik asit bakterilerinin üremesini baskılayabildiği (Takahashi ve ark., 2021) gösterilmiştir.

1.6.3.6.4. Sinnemaldehit

Tarçın yağının ana bileşeni sinnemaldehit *Cinnamomum spp.*'den elde edilmektedir ve farmakolojik etkileri arasında antidiyabetik, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, anti-oksidan, anti-ülser özellikleri yer almaktadır (Albano ve ark., 2019; Jakhetia ve ark., 2010). Çeşitli çalışmalarda sinnemaldehitin çoğunluğu algılama sistemi, FtsZ sistemi, biyofilm oluşumu, ATP ve ATPaz üretimi gibi basamaklarda inhibisyon veya zar geçirgeniğini artırma yoluyla antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Doyle ve Stephens, 2019). *E. coli* FtsZ proteinlerinin inhibisyonu ile hücre bölünmesini engellediği (Domadia ve ark., 2007); *P. aeruginosa* çoğunluğu algılama sistemini inhibe ettiği ve biyofilm oluşumunu zayıflattığı (Topa ve ark., 2020); *E. coli* ve *S. aureus* hücre zar geçirgenliğini artırdığı (Shen ve ark., 2015) gösterilmiştir.

1.6.3.6.5. Timol

Timol, kekik (*Thymus spp.*) bitkisinden elde edilen, aroması ve kokusu nedeniyle gıda ve içeceklere katılan, renksiz, kristalize bir bileşiktir (Escobar ve ark., 2020; Kachur ve Suntres, 2020). Hidrofobik yapısı ile bakteri hücre zarına entegre olmakta ve zar fonksiyonunu bozmakta, zar yağ asidi zincirlerinde birikimle zar lipit tabakasının konformasyonel yapısını değiştirmekte, sitoplazmik zar boyunca gradiyenti azaltarak ATP yoksunluğuna ve nihayetinde hücre ölümüne neden olmaktadır. Geniş panelde mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal özellik sergilemekte olup, gargara ve dental kaplamalarda antimikrobiyal özelliği nedeniyle uzun yıllardır kullanılmaktadır (Kachur ve Suntres 2020). Timolün *S. aureus* ve *S. epidermidis* biyofilm oluşturma kapasitesini doza bağımlı oranda düşürdüğü (Nostro ve ark., 2007); *E. coli* sitoplazmik zar geçirgenliğini artırdığı (Xu ve ark., 2008);

Gardnerella vaginalis biyofilm oluşumunu engellediği (Braga ve ark., 2010); *Bacillus cereus* membran potansiyelini değiştirdiği ve ATP sentezini bloke ettiği (Wang ve ark., 2022) bilinmektedir.

Biyofilm oluşumunun önlenmesi veya var olan biyofilmlerin ortadan kaldırılması için yürütülen güncel çalışmalarda geniş bir yer kaplayan antimikrobiyal ajanların bitki kökenli maddelerle kombine kullanımlarının yanısıra, çalışmaların tasarımında biyofilm matrisinde birden fazla türün bulunduğu durumların da göz önünde bulundurulması yeni yeni yaygınlaşmaktdır. Nozokomiyal enfeksiyonlarda sıkça karşılaşılan türlerden *E. faecalis, S.aureus, S. epidermidis, S. mutans, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, P. mirabilis* karma-tür kültür çalışmalarında daha sık rastlanan türleridir.

KİÜSE vakalarında *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* karma-tür biyofilm kolonizasyonunun dikkat çekmesiyle, son birkaç yılda bu iki bakterinin karma-tür biyofilmi üzerine araştırmalar ele alınmaktdır (Ballén ve ark., 2020; Galvan ve ark., 2016).

1.7. *Klebsiella pneumoniae*

İlk kez 1875 yılında Edwin Klebs pnömoniden ölen hastaların akciğer dokusunda gözlemlemiş, 1882 yılında Carl Friedländer tarafından ağır öldürücü pnömoni tablosu tarif edilerek, kapsüllenmiş bir bakteri olarak tanımlanmıştır (Austrian, 1960; Bengoechea ve Sa Pessoa, 2019). Bu nedenle yıllarca Friedländer basili olarak anılmıştır. 1887 yılında Trevisan tarafından Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'i onurlandırmak üzere *Klebsiella pneumoniae* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Brisse ve ark., 2006). *K. pneumoniae subsp. pneumoniae, K. pneumoniae subsp. ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* alttürleridir. Güncel taksonomi sınıflandırması Çizelge 1.1.'de verilmiştir (ITISa, 2021). Ayrıca gen sekansı temeline dayanan çalışmalardan elde edilen veriler ile *K. pneumoniae, K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae, K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae, K. variicola*

subsp. variicola, K. variicola subsp. tropica, K. quasivariicola ve K. africana "*Klebsiella pneumoniae* tür kompleksi (KpSC)" adı altında filogrup olarak yer almaktadır (Wyres ve ark., 2020).

Çizelge 1.1. *K. pneumoniae* taksonomi sınıflandırması

Alem	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	Enterobacterales
Aile	Enterobacteriaceae
Cins	Klebsiella
Tür	*Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, fakültatif anaerob, basil formunda bir bakteridir. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. İndol, arjinin, ornitin negatif; sitrat, voges proskauer, lizin pozitiftir. Nitratı indirger, glikozdan fermentasyonla asit ve gaz oluşturur. Laktoz, sükroz, sorbitol, adanitol, arabinozu fermente edebilir. Üreyi hidrolize eder. H_2S oluşturmaz. Agar plaklarında mukoid koloniler oluşturur. Mac Conkey agar yüzeyinde mor renkte büyük mukoid kolonileri tipiktir (Mutlu ve ark., 1999; Procop ve ark., 2017).

K. pneumoniae pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, menenjit, bakteremi, sepsis ve piyojenik karaciğer apsesi başta olmak üzere hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir (Paczosa ve Mecsas, 2016). Karbapenem, geniş spektrumlu β-laktam, kinolon, aminoglikozid, fosfomisin, trimetoprim, tigesiklin, kolistin, seftazidim-avibaktam direnci gözlenebilmektedir (Liao ve ark., 2020). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarihinde ilk kez 2017 yılında yayımlanan antibiyotiğe dirençli "öncelikli patojenler" listesinde yer almaktadır. Bu liste insan sağlığına en büyük tehdidi oluşturan ÇİD bakteri tehdidini vurgulamaktadır (DSÖ, 2017). *K. pneumoniae* antibiyotik öncesi dönemde özellikle şeker hastaları ve alkolikler başta olmak üzere toplum kökenli pnömoninin önemli bir kaynağıyken; takip eden antibiyotik çağında hastane kaynaklı enfeksiyonların

başlıca nedeni ve ciddi toplum kökenli enfeksiyonların bir risk faktörü haline gelmiştir (Wang ve ark., 2020).

Başlıca virülans faktörleri pili (tip 1 ve tip 3), kapsül, lipopolisakkarit (LPS), üreaz aktivitesi, siderofor, antibiyotik direnci ve biyofilm oluşturma şeklinde tanımlanmaktadır (Clegg ve Murphy, 2016). Bu bakterinin biyofilmi solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve idrar yollarında kolonizasyona ve ayrıca invaziv enfeksiyonların gelişmesine yol açabilmektedir (Wang ve ark., 2020). İn-vitro ortamda biyofilm oluşturduğu 1980'li yıllardan beri bilinmekte olup, in-vivo biyofilm oluşumu 1992'de asemptomatik idrar yolu enfeksiyonu olan hastanın mesane epitel hücrelerinin elektron mikroskobisinde incelenmesiyle gösterilmiştir (Jasim ve Farhan, 2020). Biyofilm oluşumunun, özellikle KİÜSE durumunda patogenezde önemli bir aşama olduğu varsayılmaktadır (Clegg ve Murphy, 2016).

1.8. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus terimi 1899 yılında Thiercelin ve Jouhand tarafından bağırsak kökenli yeni bir Gram-pozitif diplokoku tanımlamak üzere Yunanca "bağırsak" anlamına gelen enteron ve "tohum" anlamına gelen coccus sözcüklerinden türetilmiştir (Flores-Moreno ve ark., 2018). Kısa veya uzun zincirler oluşturma yeteneğine dayanarak, 1906 yılında Andrewes ve Horder *Streptococcus faecalis* adını kullanmışlardır (Devriese ve Pot, 1995). Enterokok cinsinin sınıflandırması Schleifer ve Kilpper-Balz tarafından genomik DNA çalışmalarından elde edilen verilerle 1984 yılında belirlenmiştir (Flores-Moreno ve ark., 2018). Güncel taksonomi sınıflandırması Çizelge 1.2.'de verilmiştir (ITISb, 2021).

E. faecalis Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob, diplokok formunda bir bakteridir. Katalaz negatiftir. Alfa ya da gama hemoliz gösterir. Sorbitol, mannitol, laktoz pozitiftir. Nişastayı hidrolize edemez, pirolidonil-β-naftilamidi hidrolize eder. Yüzde 6,5 sodyum klorür içeren besiyerinde ve safra-eskülin içeren besiyerinde ürer. Ayrıca, üreme ısısının 10 ila 45 °C olması cinsin

tipik özelliğidir. Agar plaklarında küçük gri koloniler oluşturur (Mutlu ve ark., 1999; Procop ve ark., 2017).

Çizelge 1.2. *E. faecalis* taksonomi sınıflandırması

Alem	Bacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Lactobacilles
Aile	Enterococcaceae
Cins	Enterococcus
Tür	*Enterococcus faecalis*

E. faecalis insanlarda çeşitli bölge floralarının doğal üyesi olmakla birlikte bakteremi, endokardit, üriner sistem enfeksiyonu başta olmak üzere beyin apsesi, cerrahi yara veya yumuşak doku enfeksiyonu, endoftalmit, periodontit, peritonit, osteomyelit ve septik artrit gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Glikopeptit grubu antibiyotik direnci oldukça yaygındır. Ayrıca, kısıtlı antibiyotik seçenekleri arasında yer alan linezolid ve daptomisin direnci olan izolatların sayısı artmaktadır (Flores-Moreno ve ark., 2018).

Sitolizin, agregasyon bileşenleri, yüzey proteinleri, kolajen bağlayan adezin, jelatinaz, serin proteaz, kapsül, hücre duvarı, ekstraselüler süperoksit ve antibiyotik direnci başlıca virülans faktörleri arasında yer almaktadır (Tendolkar ve ark., 2003). Dokuya tutunma ile başlayan biyofilm gelişimi bu bakterinin patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Theilacker ve ark., 2009). Enterokoklarda antibiyotiklere direnç ve tolerans bakımından *E. faecalis* ve *E. faecium* ele alındığında görülmüştür ki; *E. faecium* antibiyotiklere daha dirençliyken, *E. faecalis* daha kalın biyofilmler oluşturduğu için antibiyotiklere toleransı daha yüksektir. *E. faecalis* ile ilişkili enfeksiyonların çoğu karma-tür olup, özellikle KİÜSE ve yara enfeksiyonlarında enterokoklar popülasyonun önemli bir bölümünü oluşturabilmektedir (Ch'ng ve ark., 2019).

1.9. *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* Karma-tür Biyofilmi

Bu iki türün aynı ortamı paylaşımı üzerine erişilebilen en eski veri Calvet mikrokalorimetresi kullanılarak *E. faecalis, K. pneumoniae* ve bunların farklı oranlarda karışımlarının büyüme eğrilerinin planktonik ortamda incelendiği çalışmadır (Vazquez ve ark., 2013). Burada eşit oranlarda *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* ile yürütülen sette, karışık kültürdeki ısı akış-zaman eğrisinin *K. pneumoniae*' ninkiyle çok benzer olduğu ve *E. faecalis*' inkinden önemli ölçüde farklı olduğu bulunmuştur. Emzirme dönemindeki bebek dışkısından izole edilen *E. faecalis*'ten elde edilen yeni bir proteinöz enterosinin (enterosin GLHM) çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae*'nin üremesini amikasine oranla daha yüksek dozda uygulandığında engellediği, buna karşın biyofilm oluşturmasını amikasine oranla daha iyi önlediği gösterilmiştir (Mahdi ve ark., 2020).

İki türün karma-tür biyofilm oluşumuna dair ilk yayın 2016 yılına aittir (Galvan ve ark., 2016). KİÜSE gelişen 97 hastanın idrar örneklerinin incelendiği çalışmada bu iki türün % 8,5 oranında birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca in-vitro ko-kültür ile her bir türün hem monomikrbiyal hem de karma-tür biyofim gelişiminde üreme dinamiğinin benzer olduğu gösterilerek aradaki etkileşimin nötral olduğu belirtilmiştir. Çok yakın zamanda biyofilm içinde türler arası etkileşimlerin değerlendirildiği bir diğer çalışmada, glikozca zengin idrar ortamında karma-tür biyofilmde baskın türün *E. faecalis* olduğu, *K. pneumoniae* üreme dinamiğinin monomikrobiyal biyofilm gelişimine oranla azaldığı, *E. faecalis* için belirgin bir değişim olmadığı gösterilmiştir (Ballén ve ark., 2020).

Bu çalışma kapsamında *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* türlerinin karma-tür biyofilm içindeki metabolik etkileşimlerinin ve üriner sistem enfeksiyonlarında sıkça kullanılan antibiyotiklerin bazı bitki kökenli biyoaktif bileşenlerle kombinasyonunun bu karma-tür biyofilm üzerine antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13/11/2017 tarih ve 18-1124-17 no'lu kararı ile onaylanmıştır (Ek 1).

2.1. Klinik İzolatlar ve ATCC Suşları

Bu tez çalışmasında Medikal Park Hastanesi Nefroloji Anabilim Dalı'nda yatan kateterize hastalardan 26/12/2017 - 26/06/2018 tarihleri arasında rutin muayenelerde alınmış örneklerden izole edilmiş, VITEK II® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) cihazıyla tür tayinleri yapılmış, direnç profilleri çıkarılmış *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* klinik izolatları kullanılmıştır. Bu izolatlar çalışmanın yürütüldüğü Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na biyolojik materyal transfer protokolü gerekliliklerine uygun koşullarda taşınmıştır. Ayrıca, her iki bakteri türü için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarı bakteri koleksiyonunda yer alan standart suşlar arasından seçilerek, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart suşları da çalışmaya dâhil edilmiştir.

2.1.1. İzolatların Tanımlanması

Laboratuvara getirilen örneklerin tür tayinleri klasik konvansiyonel metotlarla doğrulanmıştır. Tür doğrulamasında *E. faecalis* için koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, safra eskülin hidrolizi, % 6,5 NaCl'de üreme, +45 °C'de üreme, +4 °C'de üreme, %0,04 tellüritli besiyerinde üreme testleri; *K. pneumoniae* için koloni morfolojisi, Mac Concey Agar'da üreme, Gram boyama, Oksidaz, Triple Sugar Iron Agar besiyerinde üreme, IMVIC testleri (İndol testi, Metil Red testi, Voges Proskauer testi, Sitratlı besiyerinde üreme), üre testi ve kapsül varlığı testleri yürütülmüştür (Bilgehan, 2009).

Tür tanımlamaları doğrulanan izolatlar -80±10 °C'de, gliserol-distile su (% hacim oranı 20:80) karşımı içinde stoklanmıştır.

2.1.2. İzolatların ve ATCC Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Profili

Antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenirken Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) güncel kılavuzlarında yer alan gruplara göre *E. faecalis* için ampisilin, gentamisin, siprofloksasin, linezolid, imipenem, teikoplanin, vankomisin, nitrofurantoin, trimetoprim sülfametoksazol ve *K. pneumoniae* için ampisilin, sefotaksim, sefuroksim, seftazidim, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, trimetoprim sülfametoksazol, nitrofurantoin antibiyotikleri seçilmiştir. Antibiyotik duyarlılıkları EUCAST kılavuzunda önerilen disk difüzyon metodu ile araştırılmıştır (EUCAST, 2017) . Bu amaçla, hem Enterobacterales hem de *Enterococcus spp*. için önerilen Mueller-Hinton Agar (MHA, Beckton Dickenson) besiyeri 90 mm çaplı plastik dairesel agar plaklarına 4±0,5 mm kalınlığında olması için 25 mL hacimlerde dökülmüştür. Petri plakları 5±3 °C'de ağzı bağlanmış plastik torbalarda saklanmıştır. İzolatlar Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) besiyerine ekilip, 35±1 °C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürler izotonik tuzlu su (% 0,85 NaCl) çözeltisi içinde 0,5 McFarland bulanıklık standardı yoğunluğunda süspanse edilmiştir. Bu değer ~$1x10^8$ kob/mL bakteri miktarını ifade etmektedir. Süspansiyonun yoğunluğu BİOSAN Den1B cihazı ile ölçülmüştür. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından steril eküvyonlarla oda ısısındaki yüzeyi kurutulmuş olan MHA besiyerlerine yayma metodu ile ekim yapılmıştır. Eküvyonlar bakteri süspansiyonlarına daldırıldıktan sonra tüp iç duvarında bir kez çevrilerek sıvı fazlasının bırakılmasına dikkat edilmiştir. Plaklara bakteri ekimlerinin gerçekleştirilmesinin ardından steril bir pens yardımıyla antibiyotik diskleri bu plaklara yerleştirilmiştir. Bir plağa en fazla 4 disk yerleştirilmiştir. Son olarak, plaklar ters çevrilmiş ve 35±1 °C'de 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Glikopeptid grubu antibiyotik içeren plaklarda inkübasyon süresi 24 saate tamamlanmıştır. Kalite kontrol suşları olarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarı bakteri koleksiyonunda

yer alan *E. coli* ATCC 25922 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşları belirlenmiştir. Uygun sürenin sonunda inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Sonuçlar EUCAST referans tablolarına (EUCAST, 2021) göre değerlendirilmiştir.

2.1.3. Bakterilerin Biyofilm Kapasitesinin Tespiti

Tür doğrulamaları yapılan, antibiyotik direnç profilleri çıkarılan bakterilerin bir sonraki aşamada biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. İlk olarak klinik örnek toplama döneminde, Christensen ve arkadaşlarının (1982) kullandığı yöntemde minör modifikasyonlar uygulanarak cam deney tüplerinde biyofilm oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmiştir. Bu amaçla ~$5x10^7$ kob/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonu 2 mL Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde gecelik inkübasyona bırakıldıktan sonra kültür sıvısı boşaltılarak 2 kez 2,5 mL fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Sıvı artıklarından arındırılan tüplere 2,5 mL % 0,1'lik kristal viyole çözeltisi eklenip 15-20 dk oda ısısında bekletilmiştir. Boya boşaltıldıktan sonra 3 kez 2,5 mL fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Tüplerin duvarında ve tabanında gözlenen film tabakası biyofilm oluşumu olarak değerlendirilmiştir.

Biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatların ve standart suşların mikroplaklarda biyofilm oluşturma kapasitelerini spektrofotometrik olarak ölçmek için Stepanovic ve arkadaşlarının (2007) kullandığı yöntem minör modifikasyonlarla uygulanmıştır. TSB besiyerinde 35±1 °C'de gecelik inkübasyona bırakılan kültürlerden mikroplaklara 150'şer µL inoküle edilmiştir. Kontrol amacıyla sadece besiyeri içeren kuyucuk kullanılmıştır. Sonucun güvenilirliği için 4 paralel çalışılmıştır. Mikroplaklar 35±1 °C'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüm kuyucuklar nazikçe boşaltılıp, 200'er µL önceden ısıtılmış (37 °C) fosfat tamponu ile yıkanmıştır. İşlem iki kez tekrarlanmıştır. Mikroplaklar Pasteur fırınında 60 °C' de kurumaya bırakılmıştır. Ardından kuyucuklara 200'er µL 0,1% kristal viyole çözeltisi konmuştur. Oda sıcaklığında 15-20 dk bekletildikten sonra boşaltılan kuyucuklar 3 kez 200'er µL fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Son olarak %33 glasiyel asetik asit ile birkaç kez pipetleme yapılan mikroplaklar 620 nm

dalgaboyunda optik yoğunluk cinsinden spektrofotometrik ölçüme tabi tutulmuştur. Cut-off değeri negatif kontrolün 3 standart sapmasının ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Değerlendirme Çizelge 2.1.'de belirtilen sınır değerlere göre yapılmıştır (Extremina ve ark., 2011).

Çizelge 2.1. Biyofilm kapasitelerinin optik yoğunluk cinsinden sınır değerleri

OD değeri	**Kuvveti**	**Sınıfı**
OD $\leq OD_{kontrol}$	-	negatif
$OD_{kontrol} <$ **OD** $\leq 2\ OD_{kontrol}$	+	zayıf
$2\ OD_{kontrol} <$ **OD** $\leq 4\ OD_{kontrol}$	++	orta
$4\ OD_{kontrol} <$ **OD**	+++	kuvvetli

OD: Optik dansite (spektrofotometrik olarak ölçülen yoğunluk)

2.1.4. İzolatların Seçimi

Elde edilen veriler doğrultusunda direnç profili ve biyofilm oluşturma kapasitesi mümkün olduğunca birbirinden farklı 3 ayrı karma-tür tutulum örneği oluşturmak üzere 3 *E. faecalis* ve 3 *K. pneumoniae* klinik izolatı seçilerek eşleştirilmiş, ayrıca *E. faecalis* ATCC 29212 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart suşları da eşleştirilerek 4. karma-tür tutulum örneği olarak belirlenmiştir. Klinik izolatlar günümüzde hastane ortamında mevcut izolatların davranışına ışık tutmak ve standart ATCC suşları çalışmanın gelecekte literatür ile kıyaslanabilirliğini artırmak amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

Tüm örnekler takibi kolaylaştırmak için kısa kodlar ile temsil edilmiştir. *E. faecalis* klinik izolatları E1, E2, E3, standart suşu E4 şeklinde ve *K. pneumoniae* klinik izolatları K1, K2, K3, standart suşu K4 şeklinde adlandırılmıştır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan klinik izolatların ve standart ATCC suşlarının adlandırılması

E. faecalis	***K. pneumoniae***	**Karma-tür tutulum**
E1 (klinik)	K1 (klinik)	E1K1
E2 (klinik)	K2 (klinik)	E2K2
E3 (klinik)	K3 (klinik)	E3K3
E4 (ATCC 29212)	K4 (ATCC 13883)	E4K4

2.1.5. Karma-tür Biyofilm Tutulumunun Gösterilmesi

Karma-tür tutulum için optimizasyon deneyleri %1 glikoz destekli TSB (TSB-g) besiyerinde cam deney tüpünde yürütülmüştür. Her iki bakteri türü TSB-g besiyerinde 35±1 ºC'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültürlerin 0,5 McFarland bulanıklığına seyreltilmesinin ardından 0,5 mL *E. faecalis* ve 0,5 mL *K. pneumoniae* aynı deney tüpüne inoküle edilerek biyofilm formasyonu için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda deney tüpünden kültür sıvısı dikkatlice pipetlenerek uzaklaştırıldıktan sonra, deney tüpüne 1 mL izotonik tuzlu su eklenerek 5 dakika vortekslenmiş, 1 dakika ultrasonik su banyosunda (35 kHz) bekletilmiştir. Son olarak elde edilen homojen süspansiyon bir seri sulandırım ile diğer türün üremesini inhibe edecek antibiyotik ile desteklenmiş TSA besiyerlerine 0,1 mL hacimde yayma yöntemi ile ekilmiştir. Petri plakları 35±1 ºC'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 30-300 aralığında koloniye sahip petri plaklarında sayım yapılmıştır.

2.1.6. Karma-tür Kültürde Üreme Eğrileri

Klinik izolatların ve ATCC suşlarının karma-tür kültürdeki üreme dinamiğini gözlemlemek amacıyla çalışmalarda gerekli zaman aralığını temsile yeterli olan 24 saatlik üreme grafikleri çıkarılmıştır. Bu amaçla, ~$5x10^7$ yoğunluğuna seyreltilmiş bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. Hem tüm bakteriler ayrı ayrı, hem de eşleştirilen örneklerden 10'ar mL eşit hacimlerde (örn; E1 10 mL + K1 10 mL) alınıp bir tüp içinde karışık kültür elde edilerek bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

Zaman aralığı olarak sıfır anından başlanarak ilk 8 saatte 30 dakika aralıklarla, sonrasında 60 dakika aralıklarla örnek alınıp 12 seri sulandırım yapılarak TSA besiyerine yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Karma-tür kültürlerden alınan örnekler her iki türün ayrı ayrı sayılabilmesi için diğer türün üremesini inhibe edecek antibiyotik ile desteklenmiş besiyerlerine ekilmiştir. Etüvde bir günlük inkübasyon süresi sonunda 30-300 aralığında koloniye sahip petri plaklarında sayım yapılmış, değerler logaritmik olarak işlenip zamana bağlı koloni oluşturan birim şeklinde üreme grafikleri elde edilmiştir.

2.2. Antimikrobiyal Aktivite Testleri

2.2.1. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler

Antibiyotik olarak ampisilin (Sigma-Aldrich), imipenem (ABR) ve siprofloksasin (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Antibiyotiklerin stok çözeltileri hazırlanırken kullanılan çözücü ve sulandırıcılar Çizelge 2.3.' de yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, çözücüleri ve sulandırıcıları

Madde	Çözücü	Sulandırıcı
Ampisilin	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L
Siprofloksasin	Su (ddH_2O)	Su (ddH_2O)
İmipenem	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	Fosfat tamponu, pH7.2, 0.01 mol/L

2.2.2. Antibiyotik Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Analiz sertifikalarındaki bilgiler kullanılarak "Potens = (saflık) x (aktif fraksiyon) x (1 - su içeriği)" formülü ile önce µg/mg cinsinden potens hesaplanmıştır. Ardından aşağıdaki formül ile son konsantrasyonlar elde edilmiştir.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL) x Konsantrasyon (µg/mL)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

Antibiyotik stok çözeltileri hata payını azaltmak amacıyla 100 mg antibiyotik tartılıp, uygun seyreltmeler ile 256 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.5 mL'lik mikrotüplere alikotlanarak -80±10 °C' de saklanmıştır.

2.2.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Kökenli Doğal Maddeler

Çalışmaya dâhil edilen bitki kökenli doğal maddeler kurkumin (TCI), kuersetin (Sigma-Aldrich), ögenol (Sigma-Aldrich), sinnemaldehit (Sigma-Aldrich) ve timoldür (Sigma-Aldrich). Stok çözeltileri hazırlanırken çözücü olarak toplam hacimde % 2 olacak oranda dimetilsülfoksit (DMSO) ve sulandırıcı olarak 1 birim etil alkol ve 2 birim ddH_2O kullanılmıştır (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan bitki kökenli doğal maddeler, çözücüleri ve sulandırıcıları

Madde	Çözücü	Sulandırıcı
Kurkumin	DMSO	1 birim etil alkol + 2 birim su (ddH_2O)
Kuersetin	DMSO	1 birim etil alkol + 2 birim su (ddH_2O)
Ögenol	DMSO	1 birim etil alkol + 2 birim su (ddH_2O)
Sinnemaldehit	DMSO	1 birim etil alkol + 2 birim su (ddH_2O)
Timol	DMSO	1 birim etil alkol + 2 birim su (ddH_2O)

2.2.4. Bitki Kökenli Doğal Maddelerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Bitki kaynaklı doğal maddelerin stok çözeltileri 4096 µg/mL (kurkumin, kuersetin, timol) ve 12496 µg/mL (ögenol, sinnemaldehit) konsantrasyonda ve deneylerden hemen önce hazırlanmıştır.

2.2.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Tespiti

2.2.5.1. Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması

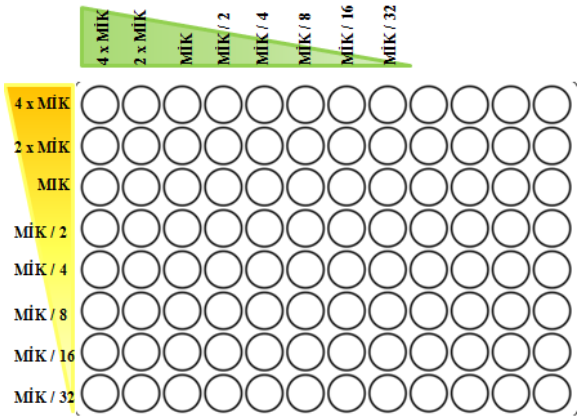
Tez çalışması boyunca yetecek miktarda hazırlanarak -80±10 ºC' de saklanan bakteri stoklarının ardışık pasajları yapılarak optimal üremenin ve metabolik faaliyetlerin gözlenebileceği üçüncü pasajlarla deneyler yürütülmüştür. Mueller Hinton Agar (MHA, Merck) besiyeri içeren petri plaklarında hazırlanan pasajlardan, izotonik tuzlu su içinde McFarland 0.5 yoğunluğunda bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Ardından bu süspansiyonlar katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (ka-MHB) besiyeri içinde final inokülum ~$5x10^5$ kob/mL yoğunluğunda olacak şekilde sulandırılmıştır (NCCLS, 1999; CLSI, 2012). Karma-tür kültürler hazırlanırken, son inokülasyon aşamasında her bir türe ait süspansiyondan eşit hacimde kullanılmıştır.

2.2.5.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

MİK değerlerini belirlemek için kullanılan bu yöntem steril plastik 96 kuyucuklu "U" tabanlı mikroplaklarda, pH 7,2-7,4 aralığında ka-MHB besiyeri kullanılarak CLSI önerilerine uygun olarak yürütülmüştür (CLSI, 2012). Mikroplağın 1'den 12'ye kadar işaretli uzun ekseni boyunca, içinde 100 µL besiyeri bulunan kuyucuklarda, eşit hacimde antimikrobiyal ajan eklenmesi ile başlanarak antimikrobiyal ajanın iki katlı seri dilüsyonu yapılmıştır. Son aşamada, hazırlanan stok bakteri süspansiyonundan aynı eksendeki kuyucuklara 100'er µL eklenmiştir. Onbirinci kuyucuk inokülasyon yapılmış sıvı besiyeri içeren pozitif üreme kontrolüdür ve antibiyotik içermemektedir. Sterilite kontrolü için onikinci kuyucuklar inoküle edilmemiş besiyeri içeren negatif kontrol kuyucuğudur. Kapakları kapatılan mikroplaklar 35±1 ºC'de, 20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından üremenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 antibiyotiklerin etkisi saptanırken deney koşullarının kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

2.2.6. Sinerji Testi

Sinerji testlerinde dama tahtası yöntemi kullanılmıştır (NCCLS, 1999). Deneyler plastik 96 kuyucuklu "U" tabanlı mikroplaklarda yürütülmüştür. Önceki aşamada MİK değerleri belirlenmiş olan tüm bitki kökenli doğal maddeler ve antibiyotikler uygun konsantrasyonlarda (MİKx4, MİKx2, MİK, MİK/2, MİK/4, MİK/8, MİK/16 ve MİK/32) ayrı ayrı kombine edilerek bu test gerçekleştirilmiştir. Bileşenlerden biri mikroplağın 1'den 12'ye kadar numaralarla işaretli uzun ekseni, diğeriyse A'dan H'ye kadar harflerle işaretli kısa ekseni doğrultusunda giderek azalan çift katlı seyreltmeleri içeren konsantrasyonlarda eşleştirilmiştir. Antimikrobiyal ajanların mikroplakta kombinasyonu için şablon Şekil 2.1.'de verilmiştir. Ardından 2.2.5.1 bölümünde anlatılan şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından antimikrobiyal ajan kombinasyonu içeren tüm kuyucuklara 100 µL hacimde eklenmiştir. Mikroplaklarda üreme kontrolü ve sterilite kontrolü kuyucuklarına yer verilmiştir. Ayrıca her test serisinde, o seride yer alan bakteri örneklerinin kullanılan MİK değerlerini doğrulamak amacıyla ilgili MİK testleri de tekrar edilmiştir. Test edilecek bitki kökenli doğal maddeler ve antibiyotikler aynı kuyucuğa konulduğunda birbirini bir kat dilüe edeceği için hazırlanan başlangıç konsantrasyonları belirlenirken bu faktör göz önünde bulundurulmuştur. Kapakları kapatılan mikroplaklar 35±1 ºC'de, 20 saat inkübe edilmiştir. Bakteri inokülasyonunun ardından, uygun inkübasyon süresi sonunda sonuçlar kaydedilmiştir.



Şekil 2.1. Mikroplakta kombinasyon için örnek şablon

Sinerji testlerinin sonucunda elde edilen verilere göre Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) indeksi hesaplanmıştır. Bu amaçla her iki maddenin FİK değeri ayrı ayrı hesaplandıktan sonra toplamları alınmıştır. FİK değerleri ise bu maddelerin kombinasyondaki MİK değerlerinin tek başına MİK değerlerine bölünmesiyle bulunmuştur. FİK indeksi değerlerinin sınıflandırılmasında farklı yorumlar mevcuttur. Bu yorumlardan birini seçerken elimizdeki sonuçları göz önünde bulundurarak veri kaybı ya da verilerin referansta dahil olmadıkları bir sınıfa yerleştirilmesi gibi durumlardan kaçınmak için literatür taraması sonucunda Çizelge 2.5.'deki sınıflandırma kullanılmıştır (Gopal ve ark., 2014).

Çizelge 2.5. FİK indeksi değerlerinin sınıflandırması

FİK İndeks Değeri	**Sınıfı**
FİK indeksi < 0.5	Sinerji
0.5 ≤ **FİK indeksi** < 1	Kısmi sinerji
FİK indeksi = 1	Aditif
2 ≤ **FİK indeksi** < 4	Etkisiz
4 < **FİK indeksi**	Antagonizm

2.2.7. Time-kill (zamana bağlı ölüm) testi

Bu test, sinerji testlerinin yürütülmesinin ardından sinerji, kısmi sinerji veya aditif etki gözlenen bileşikler/bileşik kombinasyonlarının, etki gözlenen değerlerin bir alt ve bir üst konsantrasyonlarını da içerecek şekilde yürütülmüştür (NCCLS, 1999). Mikroplaklar final inokülum ~$5x10^5$ kob/mL olacak şekilde, 200 µL hacimde 35±1 ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Üreme kontrolü ve sterilite kontrolü kuyucuklarına yer verilmiştir. Koloni sayımları için belirli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Saat aralıkları 0, 2, 4, 8 ve 24 olarak belirlenmiştir. Belirtilen zaman aralıklarında 10 µL örnek alınmış, izotonik tuzlu su içinde seri sulandırım sonrası TSA besiyerine yayma metodu ile ekim yapılmıştır. Petri plakları 35±1 ºC' de, 24-48 saat inkübe edildikten sonra yapılan koloni sayımı ile sonuçlar kob/mL olarak kaydedilmiştir.

2.3. Antibiyofilm Testleri

2.3.1. Kristal Viyole Yöntemi

Stepanovic ve arkadaşları (2007) tarafından önerilen metoda benzer şekilde yürütülmüştür. TSA besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrasında saf kültürlerden alınan koloniler 5 mL TSB besiyerine aktarılmış, 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında vortekslenmiş ve 0,5 McFarland standardı elde etmek üzere seyreltilmiştir. Mikroplaklarda antimikrobiyal bileşikler/bileşik kombinasyonları MİK/2, MİK/4, MİK/8, MİK/16 nihai konsantrasyonlarda olacak şekilde TSB besiyeri kullanılarak seyreltilmiş ve 180 µL olarak kuyucuklara eklenmiştir. Üzerine 20 µL bakteri süspansiyonu eklenen mikroplaklar 35±1 ºC'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sterilite kontrolü için sadece 200 µL besiyeri içeren kuyucuklar, üremenin kontrolü için antimikrobiyal ajan içermeyen kuyucuklar kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklar 300 µL fosfat tamponu ile yıkanmış (pipetajla), 60 ºC'de kurutulmuştur. Mikroplaklar % 0.1'lik kristal viyole ile boyanmış, kuyucuklar fosfat tamponu ile yıkanarak boya fazlası ortamdan uzaklaştırılmış, %33 glasiyel asetik asit eklenerek sonuçlar optik yoğunluk cinsinden (OD) spekrofotometre ile ölçülmüştür. Ölçümler 620 nm'de yapılmıştır. Cut-off değeri negatif kontrolün 3 standart sapmasının ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Biyofilm oluşturma kapasitesine göre değerlendirmeler Çizelge 2.1.'de verilen sınır değerlere göre yapılmıştır.

2.3.2. Biyofilmin Kateter Tutulumunun İnhibisyonu

Kateter tutulumunun inhibisyonu Kart ve arkadaşları (2017) tarafından uygulanan metoda benzer şekilde incelenmiştir. Birer cm uzunluğunda kesilen kateter örnekleri biyofilm inhibisyonu aktivitesinin gözlendiği konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan içeren 1 mL hacimdeki TSB besiyeri içeren 15 mL'lik falkon tüpleri içine yerleştirilmiştir. Üzerine final inokülüm ~10^5 KOB/mL olacak şekilde

bakteri süspansiyonu eklenmiş ve 35±1 ºC'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kateter örnekleri steril serum fizyolojik ile yıkanmış ve ardından SEM görüntüleme için hazırlanmıştır. Görüntüleme hazırlığı ise Djeribi ve arkadaşlarının (2012) kullandığı metoda göre yapılmıştır. Buna göre kateter örnekleri 0,1M (pH 7,4) kakodilat tamponunda %2'lik gluteraldehit çözeltisinde 30 dakika bekletilmiştir. Ardından 3 kez 10'ar dakikalık süreler ile 0,2 M (pH 7,4) kakodilat tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra, 10'ar dakika bir seri (%30, %50, %80) etanol çözeltisinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Etanolle muamelenin son basamağında %100 konsantrasyondaki etanol çözeltisinden 2 kez 10'ar dakika geçirilmiştir. Kurutma işleminin son aşamasında ise, 37 °C'de 24 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan örnekler Ankara Üniversitesi Nükleer Enerji Bilimleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Laboratuvarı'nda hizmet alımı ile görüntülenmiştir. Kateter örnekleri burada önce altın ile kaplanmış, ardından SEM ile görüntüleri kaydedilmiştir.

2.4. Metabolik Etkileşim Deneyleri

Metabolik etkileşim çalışmalarında E4 ve K4 olarak ifade edilen standart suşlar kullanılmıştır. Çalışmalar kullanıma hazır toz formdaki TSB (Merck) besiyeri ve laboratuvarda hazırladığımız sıvı Sentetik İdrar Besiyeri (s-SİB) (Ipe ve Ulett, 2016) ile yürütülmüştür. s-SİB besiyerine Gram pozitif bakteri gelişimini desteklemek için % 0,2 oranında maya ekstraktı (Condalab) ilave edilmiştir. Bu besiyerinin seçimi, idrar ortamını taklit eden literatürdeki çeşitli versiyonları arasından, çalışmamızda yer alan bakterilerin her ikisinin de optimum koşulda üremesine olanak sağladığı denenerek belirlenmiştir. s-SİB besiyerinin bileşimi Çizelge 2.6.' da verilmiştir.

2.4.1. Bakteri Süspansiyonları

Süpernatantsız bakteri peleti, 200 rpm çalkalama (STIK, Incubator Shaker Series, PSE-T150) ile TSB ortamında gecelik inkübasyona bırakılmış bakteri kültürlerinin 10 dakika boyunca 4000 g' de santrifüjlemesi ile elde edilmiştir. Bu peletler besiortamının etkisini ortadan kaldırmak için fosfat tamponlu salin (FTS) ile yıkandıktan sonra, yine FTS içinde çözülmüş ve McFarland 0,5 bulanıklığa ayarlanmıştır. TSB besiyerinde ~10^7 kob/mL'ye seyreltimleri yapılmıştır.

Çizelge 2.6. Sıvı Sentetik İdrar Besiyeri bileşimi (Ipe ve Ulett, 2016)

Madde	Miktar (g/L)
Sodyum klorür (NaCl), Merck	5,8440
Sodyum sülfat (Na_2SO_4), Merck	2,4147
Üre (CH_4N_2O), Acros Organics	16,8168
Potasyum klorür (KCl), Merck	2,8329
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$), Merck	0,4439
Kreatinin ($C_4H_7N_3O$), Sigma	1,0181
Sodyum sitrat dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$), Merck	1,9999
Amonyum klorür (NH_4Cl), Merck	1,0698
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$), Merck	0,3852
Sodyum oksalat ($Na_2C_2O_4$), Acros Organics	0,0241
Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4), Merck	0,5616
Disodyum fosfat (Na_2HPO_4), Merck	0,9227
Monopotasyum fosfat (KH_2PO_4), Merck	2,1774
Ürik asit ($C_5H_4N_4O_3$), Merck	0,1009
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$), Merck	1,1341
Magnezyum klorür hegzahidrat ($MgCl_2$. $6H_2O$), Merck	0,6506
L-Gliseraldehit ($C_3H_6O_3$), Merck	0,0991
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4$. $7H_2O$), Merck	0,0014

2.4.2. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Antibakteriyel Aktivitesi

Bakterilerin uçucu bileşenlerinin antibakteriyel aktivitesi Juarez ve arkadaşlarının (2020) metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak yürütülmüştür. *E. faecalis*'in ürettiği uçucu bileşenlerinin *K. pneumoniae* üremesi üzerindeki etkisini

araştırmak için Bölüm 2.4.1' de açıklandığı şekilde hazırlanan ~10^7 kob/mL konsantrasyonda 0,25 ml K4 içeren ağzı açık tüp, 15 ml hacimli vidalı kapaklı tüp içine yerleştirilerek bileşik kap sistemi oluşturulmuştur. Bu tüpün içine de 1 ml ~10^7 kob/mL konsantrasyonda E4 süspansiyonu ilave edilmiştir. Ağzı kapatıldıktan sonra, 24 saat 100 rpm'de çalkalamalı inkübasyon sonunda koloni sayımları yapılmıştır. Kontrol tüpünde dış bölmeye boş besiyeri konulmuştur. Petri plaklarında koloni sayımıyla sonuçlar değerlendirilmiştir. *K. pneumoniae*' nin ürettiği uçucu bileşenlerinin *E. faecalis* gelişimi üzerindeki etkisini araştırmak için iç tüpe E4, dış tüpe K4 konularak bu deney gerçekleştirilmiştir.

2.4.3. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Biyofilm İnhibisyonu Aktivitesi

Bakterilerin uçucu bileşenlerinin biyofilm inhibisyonu aktivitesi Juarez ve arkadaşlarının (2020) metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak yürütülmüştür. Biyofilm formuna uçucu bileşenlerin etkisi 96 kuyucuklu mikroplaklarda incelenmiştir. *E. faecalis*'in ürettiği uçucu bileşenlerinin *K. pneumoniae* biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini tespit etmek için mikroplağın ortadaki 16 kuyucuğuna 200 µL hacimde Bölüm 2.4.1'de açıklandığı şekilde hazırlanan ~10^7 kob/mL konsantrasyonda K4 eklenmiştir. Çevresindeki 48 kuyuya ~10^7 konsantrasyonda E4 eklenmiştir. Mikroplakların kapakları kapatıldıktan sonra parafilmle çevrelenip, mikroplaklar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bu deneyler iki paralel hazırlanarak hem kristal viyole ile boyama, hem de koloni sayımıyla sonuçlar değerlendirilmiştir. *K. pneumoniae*'nin ürettiği uçucu bileşenlerinin *E. faecalis* biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak için iç kuyucuklara E4, dış kuyucuklara K4 konularak bu deney gerçekleştirilmiştir.

2.4.4. Süpernatantların Antibakteriyel Aktivitesi

Bölüm 2.4.1' de belirtilen şekilde hazırlanan E4 ve K4 süspansiyonları 2'şer mL hacimde, cam deney tüplerinde 16 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre

sonunda kültürler 0.22 µm'lik tek kullanımlık filtrelerden süzülerek hücresiz süpernatantlar elde edilmiştir. Her iki türün hücresiz süpernatantının bir diğeri üzerindeki antibakteriyel etkisi sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir (CLSI, 2012).

2.4.5. Metabolomik Analiz ile Laktik Asit Etkisinin Araştırılması

Metabolomik analizler E4 ve K4 suşlarının ayrı ayrı ve karma-tür olarak TSB, s-SİB ve bu iki besiyerine %1 glikoz eklenmesiyle elde edilen besiyerlerinde (TSB-g, s-SİB-g) geliştirilen biyofilmleri üzerinde yapılmıştır. Literatürde bu iki türün biyofilm dinamiğinde laktik asitin etkili bir metabolit olduğu belirtildiği için, metabolomik analizde laktik asit referans metabolit olarak kullanılmıştır. Her iki bakteri türünün gecelik kültüründen bu besiyerleri ile ~10^7 kob/ml yoğunluğunda hazırlanan E4, K4 ve E4K4 süspansiyonları 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklarda 14 ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Karma-tür kültürde iki bakteri türü eşit oranda karıştırılmıştır. Tüm örnekler 12'şer kuyuda 4 paralel çalışılmıştır. Numune hazırlık aşaması Kart ve arkadaşlarının (2020) metodunda küçük modifikasyonlar ile yürütülmüştür. Belirtilen süreler sonunda çok hızlı biçimde mikroplakların kuyucuklarındaki kültür ortamı nazikçe boşaltılmış, kuyucuklar FTS ile yıkanmış, 3 kez sıvı azot ile muamele edildikten sonra, ortam sıcaklığında dahili standart (IS) olarak 5 µg miristik-d27 asit içeren metanol:su (9:1, v/v) karışımı eklenmiştir. Metabolizmayı hedef zaman aralığında durdurmak için bu işlemlerin dikkatlice ve hızla yapılması önem arz etmektedir. Sonraki basamakta mikroplaklar 35 kHertz'e ayarlı su banyosunda 5 dakika tutulmuştur. Ardından biyofilm tabakası kazınarak bir mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Süspansiyonlar santirfügasyona (15000 g, 15 dakika) tabi tutularak bakteri peleti dipte toplanmıştır. Elde edilen süpernatanttan 400 µL mikrosantrifüj tüpünde bir vakum yoğunlaştırıcıda kurutulmuştur. Son olarak, %1 trimetilklorosilan (MSTFA + %1 TMCS, Pierce) ile N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroasetamid kullanılarak türevlendirilmiştir.

Analizler Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GK-KS) (Shimadzu-QP2010 Ultra) kullanılarak yapılmıştır. Metabolit piklerinin veri matrisini oluşturmak için Otomatik Kütle Spektral Dekonvülsiyon ve Tanımlama Sistemi ve ardından SpectConnect kullanılarak, veri dekonvolüsyonu gerçekleştirilmiştir. Veri matrisi excel çalışma dosyasına aktarılarak normalize edilmiştir. Veri matrisindeki eksik değerler, metabolit grubundaki en küçük konsantrasyonun yarı değeri ile doldurulmuştur. Nihai veri matrisi SIMCA-P+ (v13.0, Umetrics, İsveç) programına aktarılarak değerlendirilmiştir (Nemutlu ve ark., 2015).

2.4.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler uygun olduğu durumlarda, Student-t test, SPSS programı kullanılarak ANOVA ve Duncan testleri ile yürütülmüştür.

3. BULGULAR

3.1. Bakteri İzolatları

Çalışma dâhilinde örnek toplanan tek merkezde Nefroloji Anabilim Dalı'nda yatan kateterize hastalardan ikişer adet *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* türlerinin birlikte kolonize olduğu yani karma-tür formasyon oluşturduğu izolat olmak üzere, beş *K. pneumoniae*, yedi *E. faecalis* izolatı toplanmıştır. Konvansiyonel yöntemlerle izolatların türleri doğrulanmıştır.

3.2. Bakterilerin Biyofilm Gelişimi

Cam deney tüpü ve mikroplakta kristal viyole yöntemi ile yapılan test sonucu toplanan 12 izolattan 11'inin biyofilm oluşturduğu, sadece 1 adet *K. pneumoniae* izolatının biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir.

3.3. Bakterilerin Direnç Profilleri

VITEK II® cihazı ile belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları laboratuvarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile seçilen antibiyotikler için doğrulanmıştır. Sonuçlar güncel EUCAST tablosuna göre sınıflandırılmıştır (EUCAST, 2021).

Direnç profillerine ve biyofilm kapasitelerine göre iki türden 3'er izolat seçilmiştir. Seçilen izolatlar ve ATCC suşları için duyarlılık sonuçları Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamaları için *E. faecalis* izolatları E1, E2, E3 ve ATCC 29212 suşu da E4 olarak adlandırılmıştır. *K. pneumoniae* izolatları K1, K2, K3 ve ATCC 13883 suşu da K4 olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 3.1. *E. faecalis* için disk difüzyon testi sonuçları (mm)

Antibiyotik	**Bakteri no**			
	E1	**E2**	**E3**	**E4**
Ampisilin	19*	21*	22*	20*
Gentamisin	9*	9*	-**	9*
Siprofloksasin	20*	24*	20*	22*
Linezolid	27*	25*	26*	25*
İmipenem	30	31	30	30
Teikoplanin	18*	19*	18*	18*
Vankomisin	15*	15*	15*	15*
Nitrofurantoin	21*	20*	20*	20*
Trimetoprim sülfametoksazol	21	21	-**	19

*: Duyarlı, **: Dirençli, -: 6 mm

Çizelge 3.2. *K. pneumoniae* için disk difüzyon testi sonuçları (mm)

Antibiyotik	**Bakteri no**			
	K1	**K2**	**K3**	**K4**
Ampisilin	-**	-**	-**	-**
Sefotaksim	-**	22*	23,5*	23*
Sefuroksim	-**	-**	-**	-**
Seftazidim	-	21	22,5*	33*
İmipenem	19,5	28*	31*	30*
Meropenem	22*	33*	33*	35*
Amikasin	16**	18*	20*	24*
Gentamisin	-**	14,5**	16**	17,5*
Siprofloksasin	22	22	25*	22
Levofloksasin	28*	31,5*	30*	37*
Trimetoprim sülfametoksazol	14*	22*	23*	16*
Nitrofurantoin	11,5*	11*	18*	19,5*

*: Duyarlı, **: Dirençli, -: 6 mm

3.4. Bakterilerin Biyofilm Kapasitesi

Kristal viyole ile boyama yöntemiyle mikroplaklarda 620 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir. Çizelge 2.1.'de belirtilen sınır değerlere göre yapılan sınıflandırma ile belirlenen biyofilm kapasiteleri Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.'de sunulmuştur. Tüm *E. faecalis* örnekleri kuvvetli biyofilm

oluşturmaktadır. *K. pneumoniae* örneklerinden K4 zayıf biyofilm oluştururken, diğer örnekler kuvvetli biyofilm oluşturmaktadır.

Çizelge 3.3. *E. faecalis* için biyofilm oluşturma kapasitesi

	E1	**E2**	**E3**	**E4**
TSB+G	1,4096	3,4172	2,1653	2,6985
Kapasite	+++	+++	+++	+++
TSB	0,6186	2,1166	1,3046	1,4715
Kapasite	+++	+++	+++	+++

OD $_{kont}$: 0.0814, **2x OD $_{kont}$:** 0.1628, **4x OD $_{kont}$:** 0.3256

Çizelge 3.4. *K. pneumoniae* için biyofilm oluşturma kapasitesi

	K1	**K2**	**K3**	**K4**
TSB+G	0,5797	0,5957	2,3187	0,1368
Kapasite	+++	+++	+++	+
TSB	0,4023	0,4370	0,9987	0,1426
Kapasite	+++	+++	+++	+

OD $_{kont}$: 0.0814, **2x OD $_{kont}$:** 0.1628, **4x OD $_{kont}$:** 0.3256

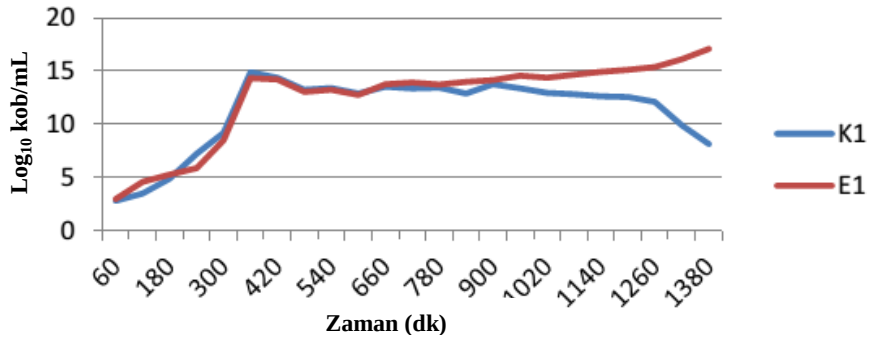
3.5. Karma-tür Tutulumun Gösterilmesi

TSB besiyerinde cam deney tüpünde her iki türden eşit hacimlerde inokülasyon ile yürütülen denemeler sırasında *K. pneumoniae*'nin sonikasyona daha duyarlı olduğu gözlenmiş ve sonikasyon süresi buna göre ayarlanmıştır. Son olarak elde edilen homojen süspansiyon bir seri sulandırım ile TSA besiyerine ekilmiş ve her iki bakterinin tekrarlı denemelerde herhangi bir destekleyici bileşen (serum v.b) eklenmesine gerek kalmaksızın başlangıçta eşit hacimlerde inokülasyon yapılarak standart bir aralıkta üretilebildiği gözlemlenmiştir.

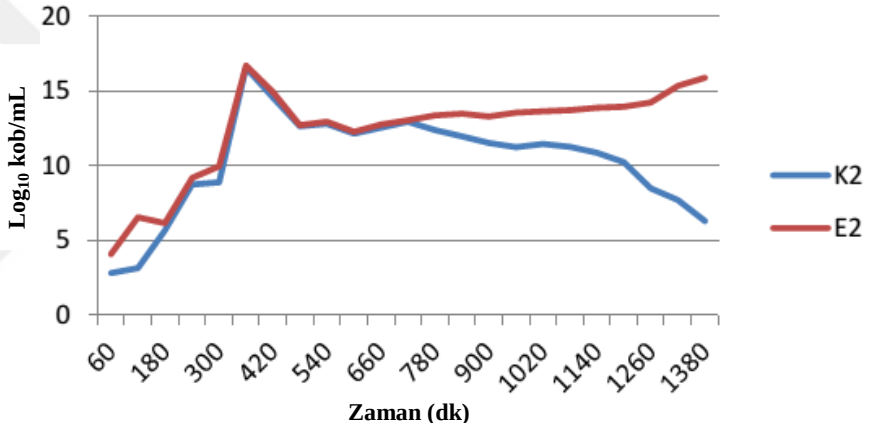
3.6. Üreme Eğrileri

Bir günlük inkübasyon süresi boyunca alınan örnekler ile dört karma-tür kültür ortamı için bakterilerin gelişim dinamiğini ortaya koyan üreme eğrileri çıkarılmıştır.

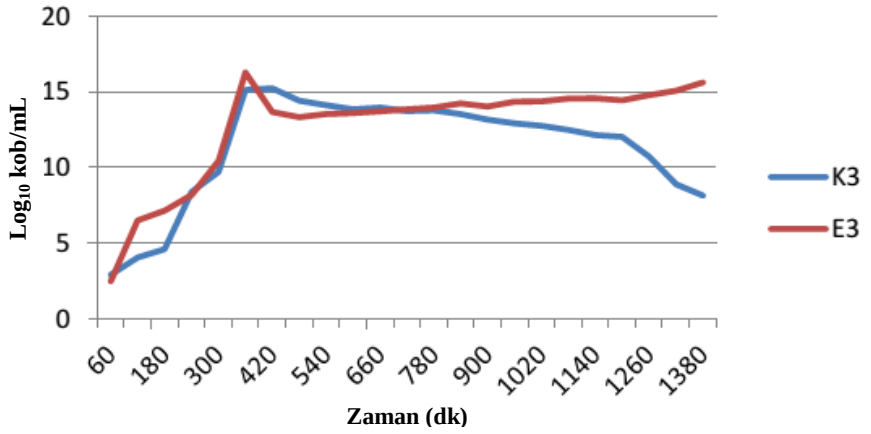
Sonuçlar Şekil 1-4'de sunulmuştur. Yatay eksende dakika cinsinden zaman, dikey eksende logaritma 10 tabanında koloni oluşturan birim değerleri verilmiştir.



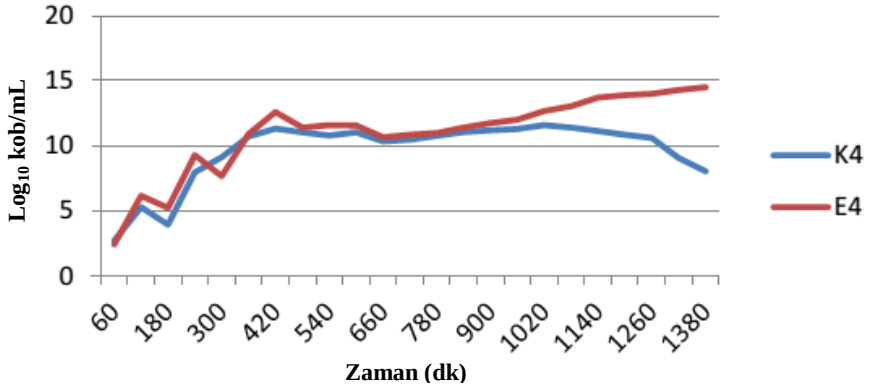
Şekil 3.1. K1E1 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi



Şekil 3.2. K2E2 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi



Şekil 3.3. K3E3 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi



Şekil 3.4. K4E4 eşleştirmesi için karma-tür üreme eğrisi

3.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Değerleri

Sıvı mikro dilüsyon testi ile izolatların ve ATCC suşlarının MİK testi sonuçları Çizelge 3.5.'de sunulmuştur. Antibiyotikler için tespit edilen değerler EUCAST güncel klinik sınır değer tablolarına göre yorumlanmıştır.

E. faecalis örneklerinin tümü ampisiline duyarlı (≤4 duyarlı, >8 dirençli), imipeneme orta duyarlı (≤0,001 duyarlı, >4 dirençli), siprofloksasine duyarlı (≤4 duyarlı, >4 dirençli) bulunmuştur.

K. pneumoniae örneklerinin tümü ampsiline dirençli (≤8 duyarlı, >8 dirençli), imipeneme duyarlı (≤2 duyarlı, >4 dirençli), siprofloksasine duyarlı (≤0,25 duyarlı, >0,5 dirençli) bulunmuştur.

Bitki kökenli doğal maddelerin MİK değerleri kurkumin için 8-128 µg/mL, kuersetin için 32-128 µg/mL, ögenol için 390,63-1562 µg/mL, sinnemaldehit için 48,83-195,32 µg/mL ve timol için 256-512 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. Her bir bakteri için ayrı ayrı antimikrobiyal ajanlar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,005$).

Çizelge 3.5. Bakterilerin test edilen antimikrobiyaller için MİK değerleri (μg/mL)

Örnek numarası	Antimikrobiyal ajanlar							
	A	**İ**	**S**	**K**	**KUE**	**Ö**	**SİN**	**T**
Monomikrobiyal								
E1	1	1	0,5	32	128	1562	97,66	256
E2	1	0,5	0,5	32	64	1562	97,66	256
E3	1	1	1	32	128	1562	97,66	512
E4	1	0,5	0,5	8	32	1562	48,83	512
K1	>64	2	0,125	64	128	781,80	195,32	256
K2	>64	0,5	0,0625	128	128	781,80	195,32	256
K3	>64	0,25	0,0312	128	128	781,80	195,32	256
K4	>64	0,5	0,125	128	128	390,63	97,66	256
Karma-tür								
E1K1	>64	1	0,5	128	128	1562	97,66	256
E2K2	>64	1	0,5	64	64	781,80	97,66	256
E3K3	64	1	1	128	64	1562	97,66	256
E4K4	>64	0,5	0,125	64	32	781,80	97,66	256

A: Ampisilin, İ: İmipenem, S: Siprofloksasin, K: Kurkumin, KUE: Kuersetin, Ö: Ögenol, SİN: Sinnemaldehit, T: Timol

3.8. Sinerji Testi Sonuçları

Ampisilinin kuersetin, kurkumin ve timol kombinasyonunda *K. pneumoniae*'nin ampisilin direnci zayıflatılamamıştır. *E. faecalis* için kuersetin ve timol kombinasyonlarında kısmi sinerji tespit edilmiş, kurkumin kombinasyonu etkisiz bulunmuştur. Ampisilin ile sinemaldehit kombinasyonu her iki bakteri için de aditif etki göstermiş, karma-tür formasyonda da aynı aditif etki gözlenmiştir. Ampisilin ile ögenol kombinasyonunda monomikrobiyal ve karma-tür formasyonların tümünde sinerjik etki gözlenen örnekler mevuttur.

İmipenemin kuersetin ve kurkumin kombinasyonunda monomikrobiyal ve karma-tür formasyonların hiçbirinde etki gözlenmemiştir. Timol kombinasyonunda *E. faecalis* için etki gözlenmemiş, K2 için kısmi sinerji, K1 ve K4 için aditif etki gözlenmiştir. Karma-tür formasyonda E1K1 ve E3K3 için aditif etki gözlenmiş, E2K2 ve E4K4 için etki gözlenmemiştir. Sinnemaldehit ile kombinasyonda E1 için kısmi sinerji, E3 için aditif etki gözlenmiştir. K1 ve K2 için aditif etki, K4 için sinerji gözlenmiştir. İmipenem ile ögenol kombinasyonunda E1, E3 ve K1 için kısmi sinerji,

E2, E4, K2, K3, K4 için sinerji, gözlenmiştir. Karma-tür formasyonda ise sadece E1K1 için sinerji gözlenmiştir.

Siprofloksasin ile kurkumin kombinasyonunda K4 için sinerji gözlenmiş, diğer örneklerde bir etki saptanamamıştır. Kuersetin ile kombinasyonda E3 için kısmi sinerji, K3 ve K4 için aditif etki gözlenmiştir. Timol kombinasyonunda ise minimum inhibisyon konsantrasyonunun düştüğü bir etkileşim görülmemiştir. Sinerji testi için elde edilen tüm sonuçlar ve hesaplamalarla elde edilen değerler Çizelge 3.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK indeksi	Etkileşim
Ampisilin + Kuersetin	E1	1	0,25	128	32	0,25	0,25	0,5	Kısmi sinerji
	E2	1	0,25	64	16	0,25	0,25	0,5	Kısmi sinerji
	E3	1	0,125	128	64	0,125	0,5	0,625	Kısmi sinerji
	E4	1	0,125	32	16	0,125	0,5	0,625	Kısmi sinerji
	K1	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	K2	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	K3	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	K4	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	E1K1	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	E2K2	R	R	64	R	-	-	-	Etkisiz
	E3K3	R	R	64	R	-	-	-	Etkisiz
	E4K4	R	R	32	R	-	-	-	Etkisiz
Ampisilin + Kurkumin	E1	1	0,125	32	64	0,125	2	2,125	Etkisiz
	E2	1	0,125	32	64	0,125	2	2,125	Etkisiz
	E3	1	0,125	32	64	0,125	2	2,125	Etkisiz
	E4	1	0,25	8	16	0,25	2	2,25	Etkisiz
	K1	R	R	64	R	-	-	-	Etkisiz
	K2	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	K3	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	K4	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	E1K1	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	E2K2	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	E3K3	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz
	E4K4	R	R	128	R	-	-	-	Etkisiz

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
Ampisilin + Ögenol	E1	1	1	1562	390	1	0,24968	1,24968	Sinerji
	E2	1	0,0625	1562	48,25	0,0625	0,03089	0,09339	Sinerji
	E3	1	0,0625	1562	195	0,0625	0,12484	0,18734	Sinerji
	E4	1	0,0625	1562	195	0,0625	0,12484	0,18734	Sinerji
	K1	R	8	781,8	390	0,0625	0,498849	0,561349	Kısmi sinerji
	K2	R	2	781,8	390	0,015625	0,498849	0,514474	Kısmi sinerji
	K3	R	1	781,8	195	0,015625	0,249424	0,265049	Sinerji
	K4	R	R	390	R	-	-	-	Etkisiz
	E1K1	R	0,5	1562	195	0,007813	0,12484	0,132652	Sinerji
	E2K2	R	0,5	781,8	195	0,007813	0,249424	0,257237	Sinerji
	E3K3	R	64	1562	390	1	0,24968	1,24968	Etkisiz
	E4K4	R	0,5	781,8	97,5	0,007813	0,124712	0,132525	Sinerji
Ampisilin + Sinnemaldehit	E1	1	0,5	97,66	48,83	0,5	0,5	1	Aditif
	E2	1	0,5	97,66	48,83	0,5	0,5	1	Aditif
	E3	1	0,125	97,66	97,66	0,125	1	1,125	Aditif
	E4	1	0,125	97,66	97,66	0,125	1	1,125	Aditif
	K1	R	1	195,32	195,32	0,007813	1	1,007813	Aditif
	K2	R	1	195,32	195,32	0,007813	1	1,007813	Aditif
	K3	R	0,5	195,32	195,32	0,007813	1	1,007813	Aditif
	K4	R	1	97,66	97,66	0,007813	0,993242	1,001054	Aditif
	E1K1	R	0,5	97,66	97,66	0,003906	0,993242	0,997148	Kısmi sinerji
	E2K2	R	0,25	97,66	97,66	0,001953	1	1,001953	Aditif
	E3K3	R	1	97,66	97,66	0,015625	1	1,015625	Sinerji
	E4K4	R	1	97,66	97,66	0,007813	1	1,007813	Sinerji

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
Ampisilin + Timol	E1	1	0,25	256	128	0,25	0,5	0,75	Kısmi sinerji
	E2	1	0,125	256	128	0,125	0,5	0,625	Kısmi sinerji
	E3	1	0,125	512	128	0,125	0,25	0,375	Kısmi sinerji
	E4	1	0,25	512	64	0,25	0,125	0,375	Kısmi sinerji
	K1	R	R	256	R	-	-	-	Etkisiz
	K2	R	R	256	R	-	-	-	Etkisiz
	K3	R	R	256	R	-	-	-	Etkisiz
	K4	R	R	256	R	-	-	-	Etkisiz
	E1K1	R	R	R	R	-	-	-	Etkisiz
	E2K2	R	R	R	R	-	-	-	Etkisiz
	E3K3	R	R	R	R	-	-	-	Etkisiz
	E4K4	R	R	R	R	-	-	-	Etkisiz
İmipenem + Kuersetin	E1	1	1	128	256	1	2	3	Etkisiz
	E2	0,5	0,5	64	128	1	2	3	Etkisiz
	E3	1	1	128	256	1	2	3	Etkisiz
	E4	0,5	0,5	32	32	1	1	2	Etkisiz
	K1	2	2	128	256	1	2	3	Etkisiz
	K2	0,5	0,5	128	256	1	2	3	Etkisiz
	K3	0,25	0,5	128	256	2	2	4	Etkisiz
	K4	0,5	1	128	128	2	1	3	Etkisiz
	E1K1	1	1	128	128	1	1	2	Etkisiz
	E2K2	1	1	64	64	1	1	2	Etkisiz
	E3K3	1	0,5	64	64	0,5	1	1,5	Etkisiz
	E4K4	0,5	0,5	32	16	1	0,5	1,5	Etkisiz

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
İmipenem + Kurkumin	E1	1	1	32	32	1	1	2	Etkisiz
	E2	0,5	1	32	16	2	0,5	2,5	Etkisiz
	E3	1	1	32	64	1	2	3	Etkisiz
	E4	1	1	8	16	1	2	3	Etkisiz
	K1	2	2	64	64	1	1	2	Etkisiz
	K2	0,5	0,5	128	128	1	1	2	Etkisiz
	K3	0,25	0,25	128	256	1	2	3	Etkisiz
	K4	0,5	0,5	128	128	1	1	2	Etkisiz
	E1K1	1	1	128	128	1	1	2	Etkisiz
	E2K2	1	1	64	128	1	2	3	Etkisiz
	E3K3	1	1	128	128	1	1	2	Etkisiz
	E4K4	0,5	0,5	64	128	1	2	3	Etkisiz
İmipenem + Ögenol	E1	1	0,0156	1562	781	0,0156	0,5	0,5156	Kısmi sinerji
	E2	0,5	0,0078	1562	390	0,0156	0,24968	0,26528	Sinerji
	E3	1	0,5	1562	390	0,5	0,24968	0,74968	Kısmi sinerji
	E4	0,5	0,0625	1562	390	0,125	0,24968	0,37468	Sinerji
	K1	2	0,125	781,8	390	0,0625	0,498849	0,561349	Kısmi sinerji
	K2	0,5	0,00195	781,8	195	0,0039	0,249424	0,253324	Sinerji
	K3	0,25	0,00195	781,8	195	0,0078	0,249424	0,257224	Sinerji
	K4	0,5	0,078	390,63	48,25	0,156	0,123518	0,279518	Sinerji
	E1K1	1	0,25	1562	390	0,25	0,24968	0,49968	Sinerji
	E2K2	0,5	0,125	1562	781	0,25	0,5	0,75	Kısmi sinerji
	E3K3	1	0,5	1562	781	0,5	0,5	1	Aditif
	E4K4	0,5	0,125	781,8	781	0,25	0,998977	1,248977	Etkisiz

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
İmipenem + Sinnemaldehit	E1	1	0,25	97,66	48,83	0,25	0,5	0,75	Kımi sinerji
	E2	0,5	0,5	97,66	48,83	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E3	1	0,5	97,66	48,83	0,5	0,5	1	Aditif
	E4	0,5	0,25	48,83	48,83	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K1	2	1	195,32	97,5	0,5	0,499181	0,999181	Aditif
	K2	0,5	0,25	195,32	97,5	0,5	0,499181	0,999181	Aditif
	K3	0,25	0,25	195,32	97,5	1	0,499181	1,499181	Etkisiz
	K4	0,5	0,0625	97,66	6,1	0,125	0,062462	0,187462	Sinerji
	E1K1	1	0,5	97,66	97,66	0,5	1	1,5	Etkisiz
	E2K2	0,5	0,5	97,66	48,83	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E3K3	0,5	0,5	97,66	48,83	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E4K4	0,5	0,25	97,66	48,83	1	0,5	1,5	Etkisiz
İmipenem + Timol	E1	1	1	256	128	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E2	0,5	1	256	256	2	1	3	Etkisiz
	E3	1	1	512	256	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E4	0,5	1	512	256	2	0,5	2,5	Etkisiz
	K1	2	1	256	128	0,5	0,5	1	Aditif
	K2	0,5	0,125	256	128	0,25	0,5	0,75	Kımi sinerji
	K3	0,25	0,25	256	128	1	0,5	1,5	Etkisiz
	K4	0,5	0,25	256	128	0,5	0,5	1	Aditif
	E1K1	1	0,5	256	128	0,5	0,5	1	Aditif
	E2K2	1	1	256	256	1	1	2	Etkisiz
	E3K3	1	0,5	256	128	0,5	0,5	1	Aditif
	E4K4	0,5	1	256	256	2	1	3	Etkisiz

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
Siprofloksasin + Kuersetin	E1	0,5	0,5	128	64	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E2	0,5	1	64	64	2	1	3	Etkisiz
	E3	1	0,25	128	64	0,25	0,5	0,75	Kısmi sinerji
	E4	0,5	0,25	32	32	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K1	0,125	0,25	128	8	2	0,0625	2,0625	Etkisiz
	K2	0,0625	0,0625	128	64	1	0,5	1,5	Etkisiz
	K3	0,0312	0,0156	128	64	0,5	0,5	1	Aditif
	K4	0,125	0,0625	128	64	0,5	0,5	1	Aditif
	E1K1	0,5	0,5	128	128	1	1	2	Etkisiz
	E2K2	0,5	0,5	64	128	1	2	3	Etkisiz
	E3K3	1	0,5	64	64	0,5	1	1,5	Etkisiz
	E4K4	0,125	0,25	32	16	2	0,5	2,5	Etkisiz
Siprofloksasin + Kurkumin	E1	0,5	0,25	32	64	0,5	2	2,5	Etkisiz
	E2	0,5	0,125	32	64	0,25	2	2,25	Etkisiz
	E3	1	0,25	32	64	0,25	2	2,25	Etkisiz
	E4	0,5	0,25	8	16	0,5	2	2,5	Etkisiz
	K1	0,125	0,25	64	32	2	0,5	2,5	Etkisiz
	K2	0,0625	0,0625	128	64	1	0,5	1,5	Etkisiz
	K3	0,0312	0,0625	128	8	2,003205	0,0625	2,065705	Etkisiz
	K4	0,125	0,0312	128	32	0,2496	0,25	0,4996	Sinerji
	E1K1	0,5	0,5	128	64	1	0,5	1,5	Etkisiz
	E2K2	0,5	0,5	64	64	1	1	2	Etkisiz
	E3K3	1	0,5	128	256	0,5	2	2,5	Etkisiz
	E4K4	0,125	0,25	64	16	2	0,25	2,25	Etkisiz

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
Siprofloksasin + Ögenol	E1	0,5	0,125	1562	195	0,25	0,12484	0,37484	Sinerji
	E2	0,5	0,0312	1562	195	0,0624	0,12484	0,18724	Sinerji
	E3	1	0,25	1562	195	0,25	0,12484	0,37484	Sinerji
	E4	0,5	0,125	1562	195	0,25	0,12484	0,37484	Sinerji
	K1	0,125	0,0625	781,8	97,5	0,5	0,124712	0,624712	Kısmi sinerji
	K2	0,0625	0,0312	781,8	97,5	0,4992	0,124712	0,623912	Kısmi sinerji
	K3	0,0312	0,0312	781,8	97,5	1	0,124712	1,124712	Etkisiz
	K4	0,125	0,125	390,63	195	1	0,499194	1,499194	Etkisiz
	E1K1	0,5	0,125	1562	97,66	0,25	0,062522	0,312522	Sinerji
	E2K2	0,5	0,125	781,8	24	0,25	0,030698	0,280698	Sinerji
	E3K3	1	0,25	1562	48	0,25	0,03073	0,28073	Sinerji
	E4K4	0,125	0,0625	781,8	97,5	0,5	0,124712	0,624712	Kısmi sinerji
Siprofloksasin + Sinnemaldehit	E1	0,5	0,25	97,66	48,83	0,5	0,5	1	Aditif
	E2	0,5	0,25	97,66	48,83	0,5	0,5	1	Aditif
	E3	1	0,125	97,66	48,83	0,125	0,5	0,625	Kısmi sinerji
	E4	0,5	0,25	48,83	48,83	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K1	0,125	0,0625	195,32	195,32	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K2	0,0625	0,0312	195,32	97,66	0,4992	0,5	0,9992	Aditif
	K3	0,0312	0,0156	195,32	97,66	0,5	0,5	1	Aditif
	K4	0,125	0,0078	97,66	3	0,0624	0,030719	0,093119	Sinerji
	E1K1	0,5	0,0156	97,66	97,66	0,0312	1	1,0312	Aditif
	E2K2	0,5	0,0156	97,66	97,66	0,0312	1	1,0312	Aditif
	E3K3	1	0,5	97,66	48	0,5	0,491501	0,991501	Aditif
	E4K4	0,125	0,0625	97,66	48	0,5	0,491501	0,991501	Aditif

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Çizelge 3.6. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği sinerji testi sonuçları, devam

Antimikrobiyal Madde	Bakteri	MİK A	MİK Kombinasyon	MİK B	MİK Kombinasyon	FİK A	FİK B	FİK İndeksi	Etkileşim
Siprofloksasin + Timol	E1	0,5	0,5	256	256	1	1	2	Etkisiz
	E2	0,5	0,125	256	256	0,25	1	1,25	Etkisiz
	E3	1	0,156	512	512	0,156	1	1,156	Etkisiz
	E4	0,5	0,25	512	512	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K1	0,125	0,0625	256	256	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K2	0,0625	0,0625	256	256	1	1	2	Etkisiz
	K3	0,0312	0,0156	256	256	0,5	1	1,5	Etkisiz
	K4	0,125	0,0625	256	256	0,5	1	1,5	Etkisiz
	E1K1	0,5	0,25	256	256	0,5	1	1,5	Etkisiz
	E2K2	0,25	0,25	256	256	1	1	2	Etkisiz
	E3K3	0,5	0,5	256	256	1	1	2	Etkisiz
	E4K4	0,25	0,125	256	256	0,5	1	1,5	Etkisiz

R: Dirençli, -: etki değeri yok

Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, monomikrobiyal ve karma-tür grupları farkı kendi içinde anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kombinasyonların etkisi karşılaştırıldığında, monomikrobiyal grup içinde 4 farklı seviyede etki istatistiksel olarak anlamlı gözlenmiştir (Çizelge 3.7.). Buna göre etki düzeyi en yüksek grupta ögenolün ampisilin, imipenem ve siprofloksasin ile kombinasyonları yer alırken, ampisilin ve imipenemin kurkuminle ve imipenemin kuersetinle kombinasyonları etkisiz gözlenmiştir. Karma-tür grup içindeyse etki seviyesine göre 2 alt grup oluşmuştur (Çizelge 3.8.). Buna göre etki düzeyi yüksek grupta ögenolün ampisilin ve siprofloksasin ile kombinasyonları ve sinnemaldehitin ampisilin ile kombinasyonu yer almıştır. Monomikrobiyal ve karma-tür grupları duyarlılık açısından karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.9.) ($p>0,05$). Son olarak, tüm gruplar bir arada değerlendirildiğinde etki düzeyine göre 5 alt grup oluşmuştur (Çizelge 3.10.). Buna göre etki düzeyi en yüksek grupta ögenolün ampisilin, imipenem ve siprofloksasin ile kombinasyonları yer almış, ampisilin ve imipenemin kurkuminle ve imipenemin kuersetinle kombinasyonları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 3.7. Sinerji testinde monomikrobiyal grup için etki düzeyleri (Duncan testi)

Kombinasyon	**N**	**Sub α = 0.05**			
		1	**2**	**3**	**4**
İmipenem-Ögenol	8	1.38			
Ampisilin-Ögenol	8	1.63			
Siprofloksasin-Ögenol	8	2.00	2.00		
Siprofloksasin-Timol	8		2.88	2.88	
Siprofloksasin-Sinnemaldehit	8		2.88	2.88	
Ampisilin-Timol	8			3.00	3.00
Ampisilin-Kuersetin	8			3.00	3.00
İmipenem-Sinnemaldehit	8			3.00	3.00
Ampisilin-Sinnemaldehit	8			3.38	3.38
İmipenem-Timol	8			3.50	3.50
Siprofloksasin-Kuersetin	8			3.50	3.50
Siprofloksasin-Kurkumin	8			3.63	3.63
Ampisilin-Kurkumin	8				4.00
İmipenem-Kurkumin	8				4.00
İmipenem-Kuersetin	8				4.00
Anlamlılık (p<0,05)		.173	.055	.145	.051

Çizelge 3.8. Sinerji testinde karma-tür grup için etki düzeyleri (Duncan testi)

Kombinasyon	N	Sub α = 0.05	
		1	2
Siprofloksasin-Ögenol	4	1.25	
Ampisilin-Ögenol	4	1.75	
Ampisilin-Sinnemaldehit	4	1.75	
Siprofloksasin-Sinnemaldehit	4		3.00
İmipenem-Ögenol	4		3.25
Siprofloksasin-Timol	4		3.25
İmipenem-Timol	4		3.50
Ampisilin-Timol	4		4.00
Ampisilin-Kurkumin	4		4.00
Ampisilin-Kuersetin	4		4.00
İmipenem-Sinnemaldehit	4		4.00
İmipenem-Kurkumin	4		4.00
İmipenem-Kuersetin	4		4.00
Siprofloksasin-Kurkumin	4		4.00
Siprofloksasin-Kuersetin	4		4.00
Anlamlılık (p<0,05)		.308	.073

Çizelge 3.9. Sinerji testinde monomikrobiyal ve karma-tür grup kıyaslaması (Oneway ANOVA testi)

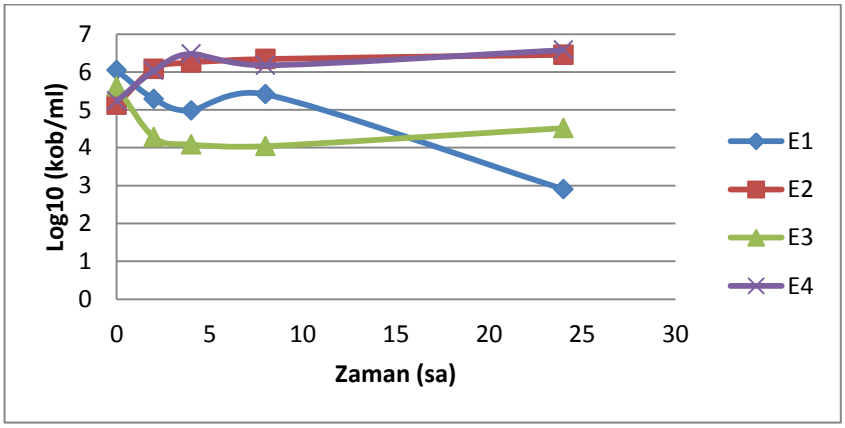
Bakteri Grubu		Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Anlamlılık (p<0,05)
Mono	Gruplar arası	7.033	7	1.005	.767	.616
	Grup içi	146.667	112	1.310	-	-
	Toplam	153.700	119		-	-
Karma-tür	Gruplar arası	2.450	3	.817	.667	.576
	Grup içi	68.533	56	1.224	-	-
	Toplam	70.983	59		-	-

Çizelge 3.10. Sinerji testinde tüm gruplar arası etki düzeyi kıyaslaması (Duncan testi)

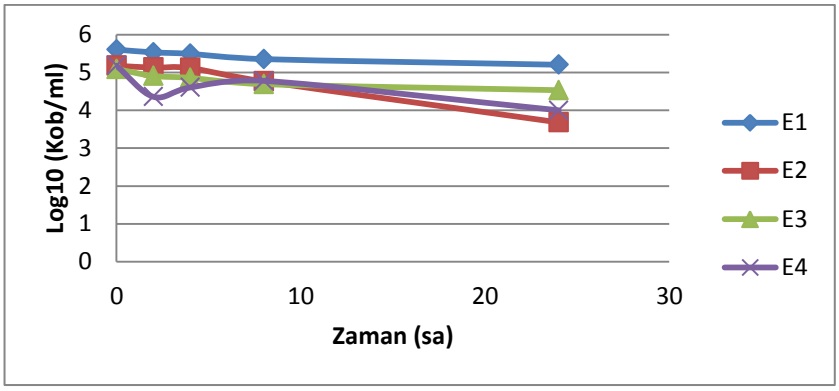
Kombinasyon	N	Sub α = 0.05				
		1	2	3	4	5
Ampisilin-Ögenol	12	1.67				
Siprofloksasin-Ögenol	12	1.75				
İmp-Ögenol	12	2.00				
Ampisilin-Sinnemaldehit	12		2.83			
Siprofloksasin-Sinnemaldehit	12		2.92	2.92		
Siprofloksasin-Timol	12		3.00	3.00	3.00	
Ampisilin-Timol	12		3.33	3.33	3.33	3.33
Ampisilin-Kuersetin	12		3.33	3.33	3.33	3.33
İmipenem-Sinnemaldehit	12		3.33	3.33	3.33	3.33
İmipenem-Timol	12		3.50	3.50	3.50	3.50
Siprofloksasin-Kuersetin	12			3.67	3.67	3.67
Siprofloksasin-Kurkumin	12				3.75	3.75
Ampisilin-Kurkumin	12					4.00
İmipenem-Kurkumin	12					4.00
İmipenem-Kuersetin	12					4.00
Anlamlılık (p<0,05)		.378	.106	.068	.068	.115

3.9. Time kill (zamana bağlı ölüm) testi sonuçları

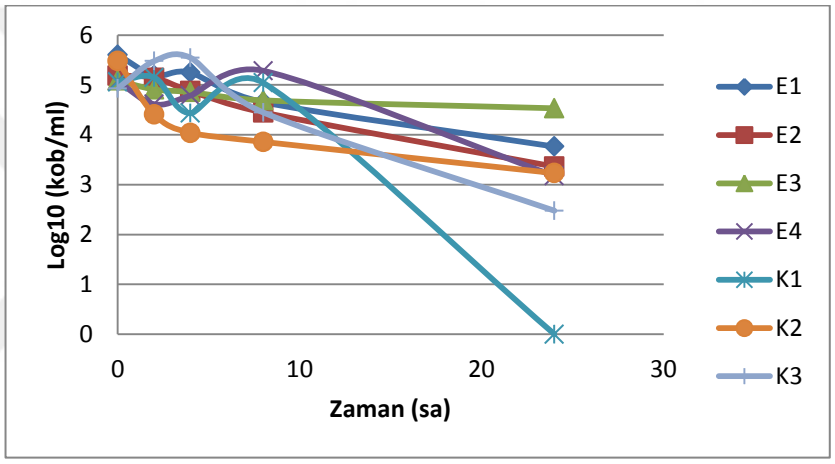
Sinerji, kısmi sinerji veya aditif etki gözlenen bileşikler/bileşik kombinasyonları için, etki gözlenen değerlere dair zamana bağlı ölüm grafikleri Şekil 5-23' de sunulmuştur.



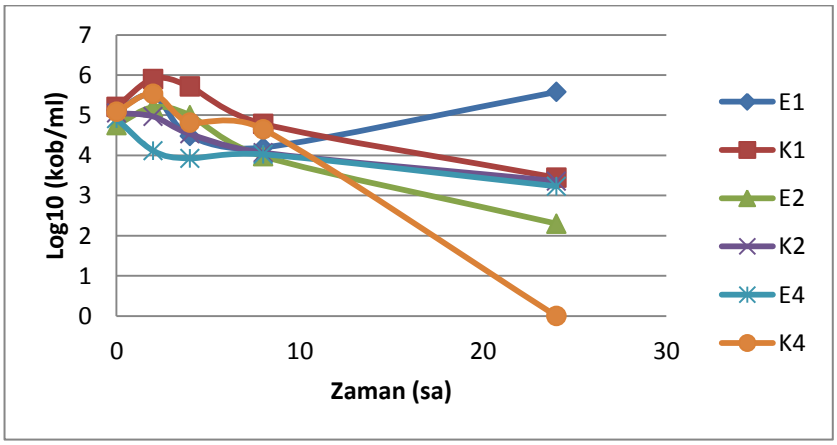
Şekil 3.5. Ampisilin-Kuersetin kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



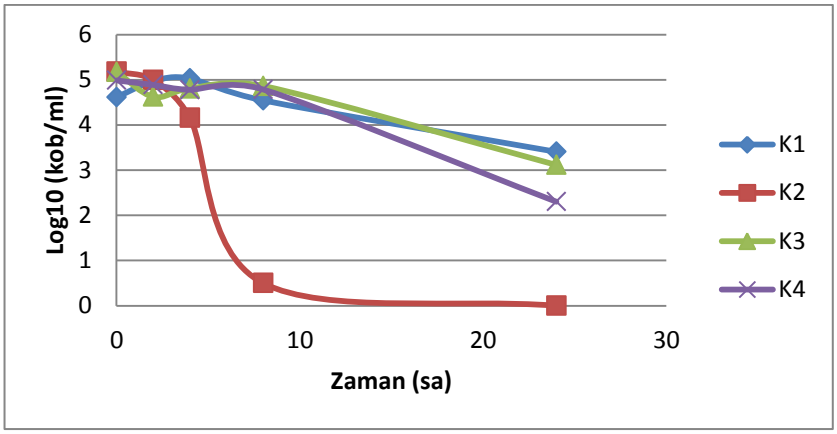
Şekil 3.6. Ampisilin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



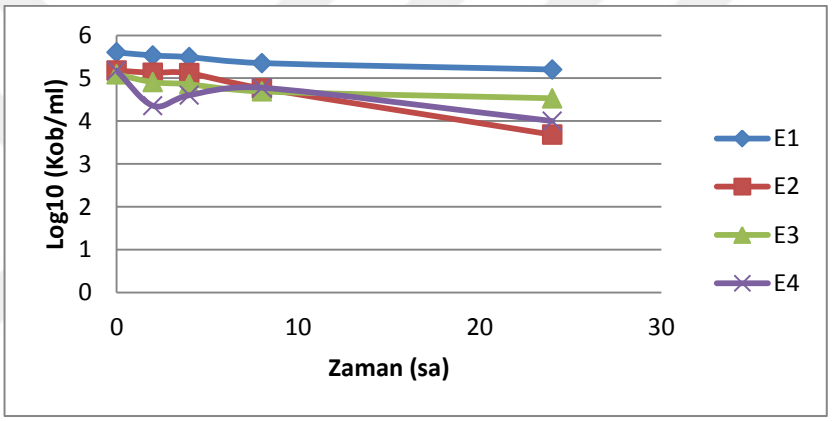
Şekil 3.7. Ampisilin-Ögenol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



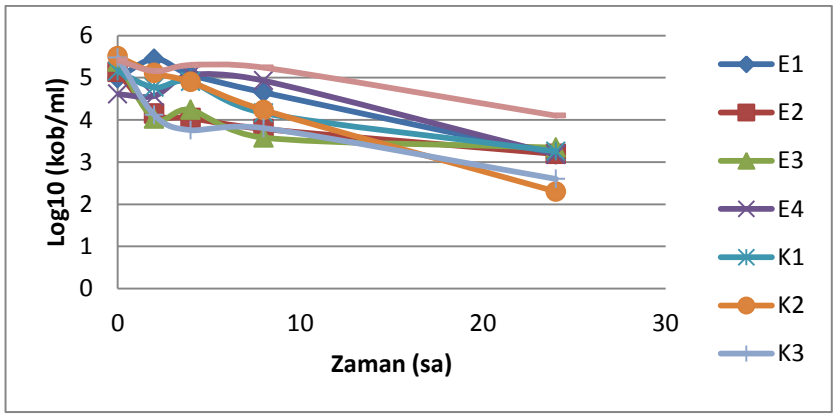
Şekil 3.8. Ampisilin-Ögenol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği



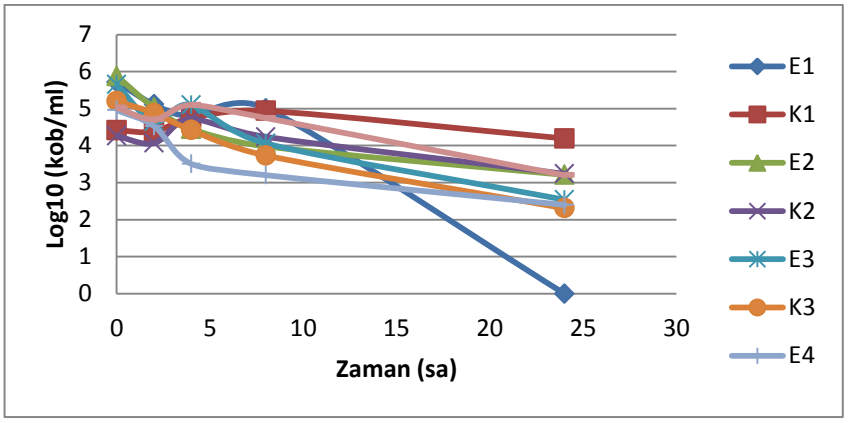
Şekil 3.9. Ampisilin-Sinnemaldehit kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



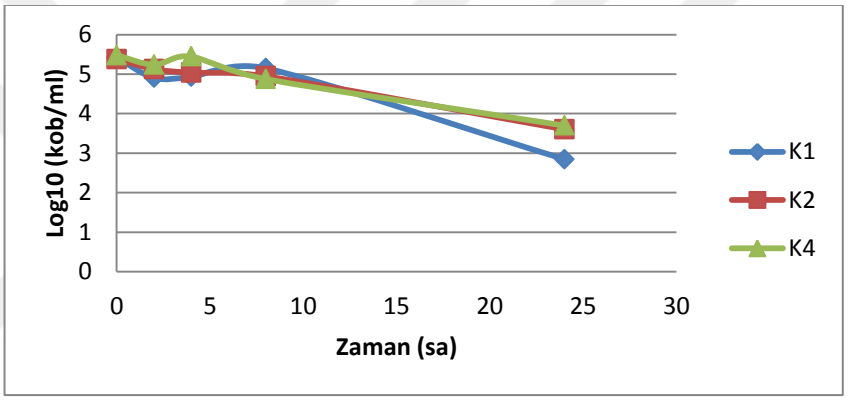
Şekil 3.10. Ampisilin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



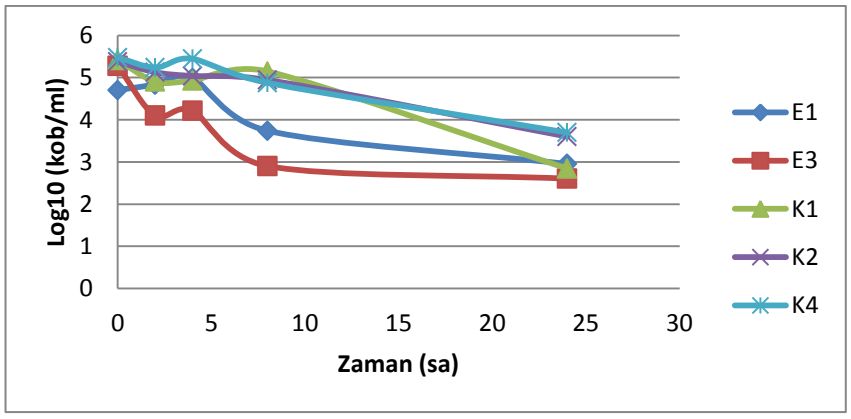
Şekil 3.11. İmipenem-Ögenol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



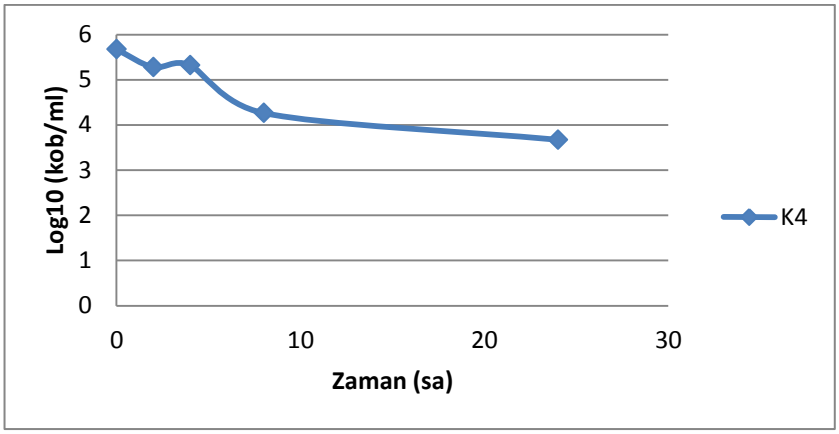
Şekil 3.12. İmipenem-Ögenol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği



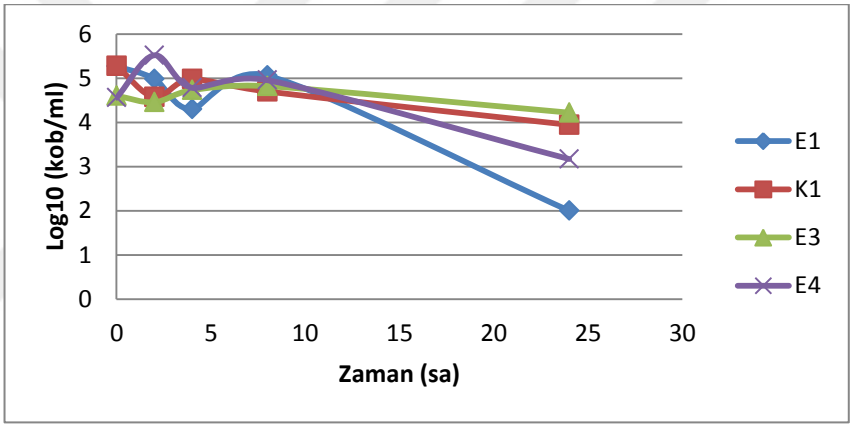
Şekil 3.13. İmipenem-Sinnemaldehit kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



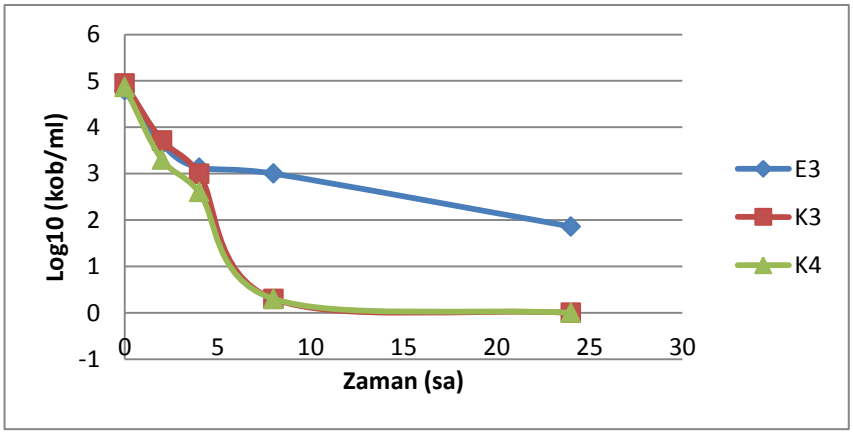
Şekil 3.14. İmipenem-Sinnemaldehit kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği



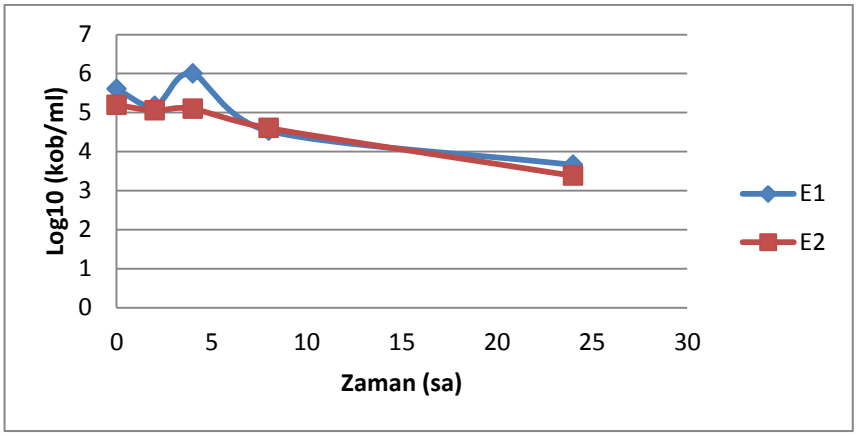
Şekil 3.15. İmipenem-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



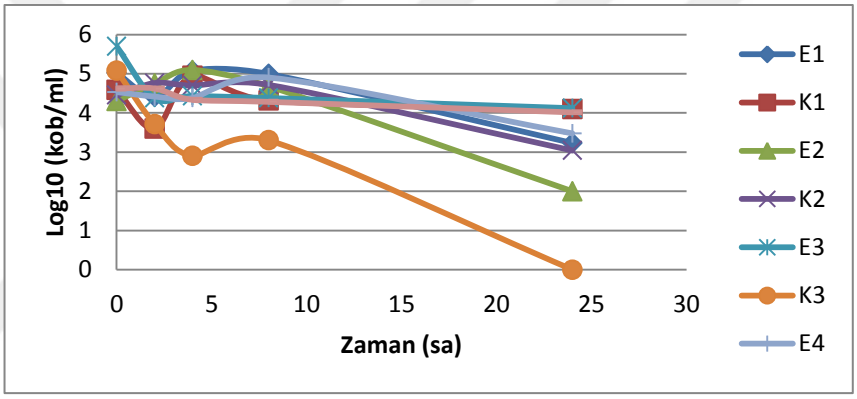
Şekil 3.16. İmipenem-Timol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği



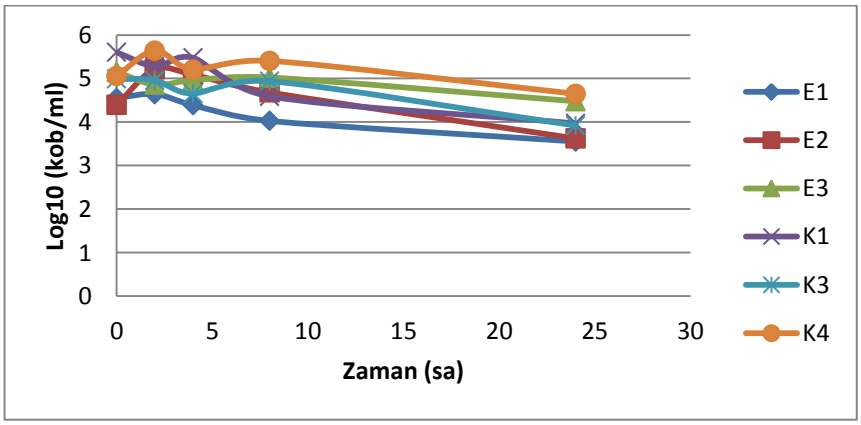
Şekil 3.17. Siprofloksasin-Kuersetin kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



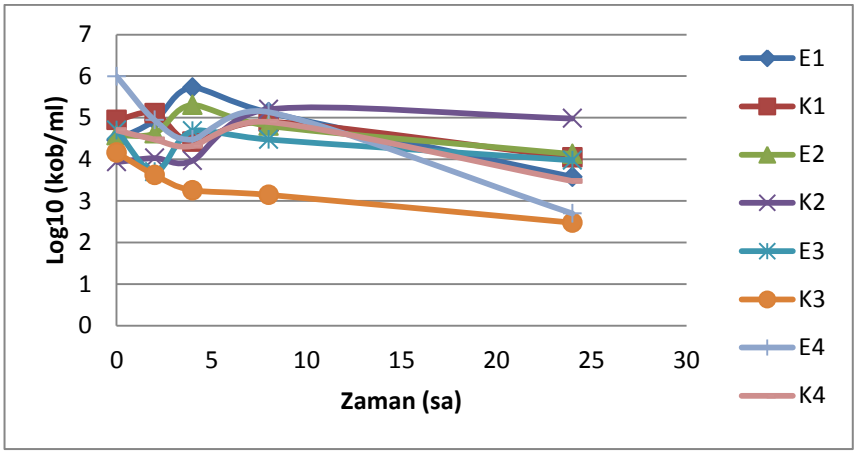
Şekil 3.18. Siprofloksasin-Ögenol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



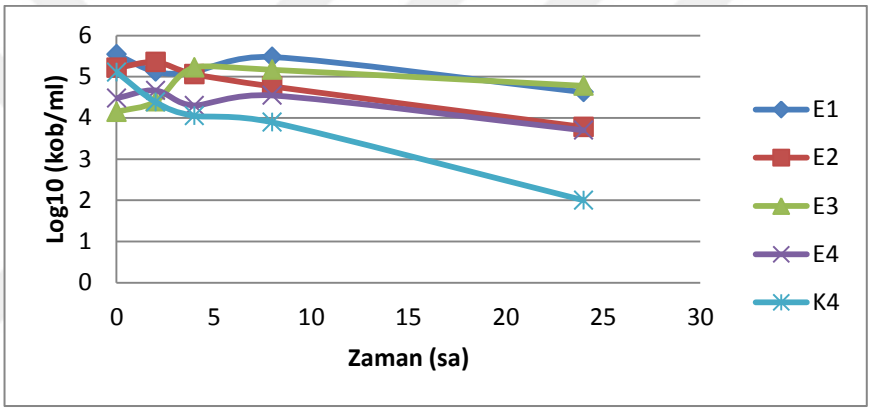
Şekil 3.19. Siprofloksasin-Ögenol kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği



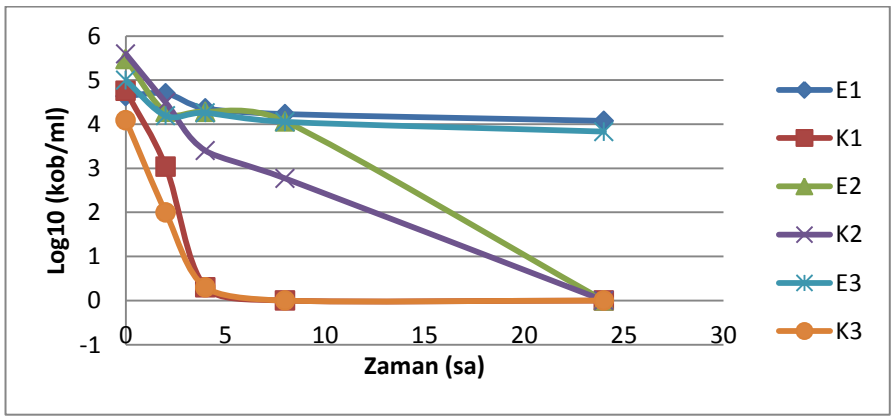
Şekil 3.20. Siprofloksasin-Sinnemaldehit kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



Şekil 3.21. Siprofloksasin-Sinnemaldehit kombinasyonunun karma-tür üreme grafiği



Şekil 3.22. Siprofloksasin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği



Şekil 3.23. Siprofloksasin-Timol kombinasyonunun monomikrobiyal üreme grafiği

3.10. Antibiyofilm Etki Sonuçları

3.10.1. Kristal Viyole Yöntemi

Sinerji testi sonucunda sinerjik, kısmi sinerjik ve aditif etki gözlenen kombinasyonlarda kristal viyole yöntemi ile biyofilm oluşumunun inhibe edilip edilmediği test edilmiştir.

Test sonucunda MİK/2 konsantrasyonda ampisilin+sinnemaldehit kombinasyonunun E1, E1K1 ve E2K2 örneklerinde biyofilm kapasitesini 1 derece düşürdüğü; ampisilin+ögenol kombinasyonunun K1 biyofilm kapasitesini 1 derece düşürdüğü; siprofloksasin+sinnemaldehit kombinasyonunun K2 biyofilm kapasitesini 1 derece düşürdüğü; imipenem+sinnemaldehit kombinasyonunun K1 biyofilm kapasitesini 1 derece düşürdüğü; imipenem+ögenol kombinasyonunun K2 ve K3 biyofilm kapasitesini 1 derece düşürdüğü gözlenmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda muamele ile herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Biyofilm oluşturma kapasitesindeki değişime dayalı sonuçlar Çizelge 3.11.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.11. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği antibiyofilm testi sonuçları

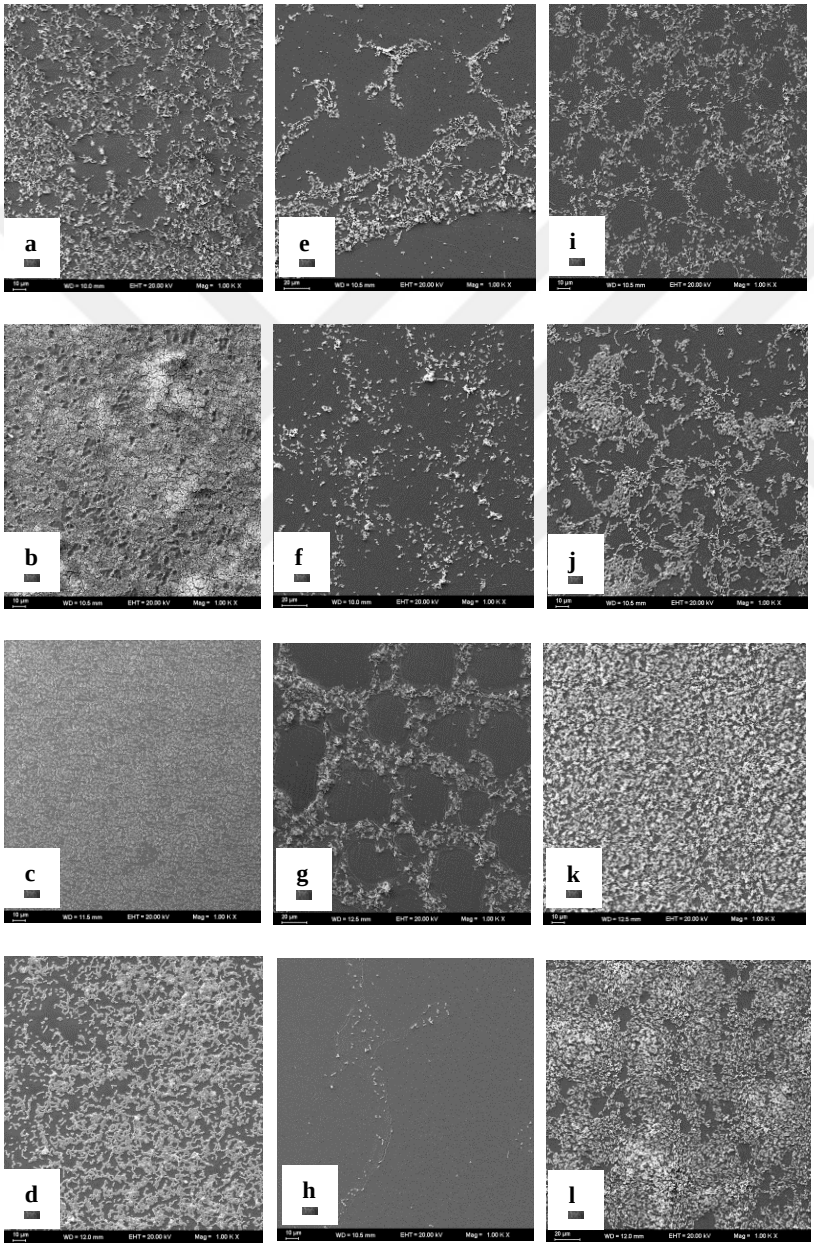
Antimikrobiyal Madde	Bakteri	Biyofilm düzeyi	Muamele sonrası biyofilm düzeyi
Ampisilin + Kuersetin	E1	+++	+++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	E4	+++	+++
Ampisilin + Ögenol	E1	+++	+++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	E4	+++	+++
	K1	+++	+++
	K2	+++	+++
	K3	+++	+++
	E1K1	+++	+++
	E2K2	+++	+++
	E4K4	+++	+++
Ampisilin + Sinnemaldehit	E1	+++	++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	E4	+++	+++
	K1	+++	+++
	K2	+++	+++
	K3	+++	+++
	K4	+	+
	E1K1	+++	++
	E2K2	+++	++
Ampisilin + Timol	E1	+++	+++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	E4	+++	+++
İmipenem + Ögenol	E1	+++	+++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	E4	+++	+++
	K1	+++	+++
	K2	+++	++
	K3	+++	++
	K4	+	+
	E1K1	+++	+++
	E2K2	+++	+++
	E3K3	+++	+++

Çizelge 3.11. Antibiyotikler ile bitki kökenli doğal maddelerin kombine edildiği antibiyofilm testi sonuçları (devam)

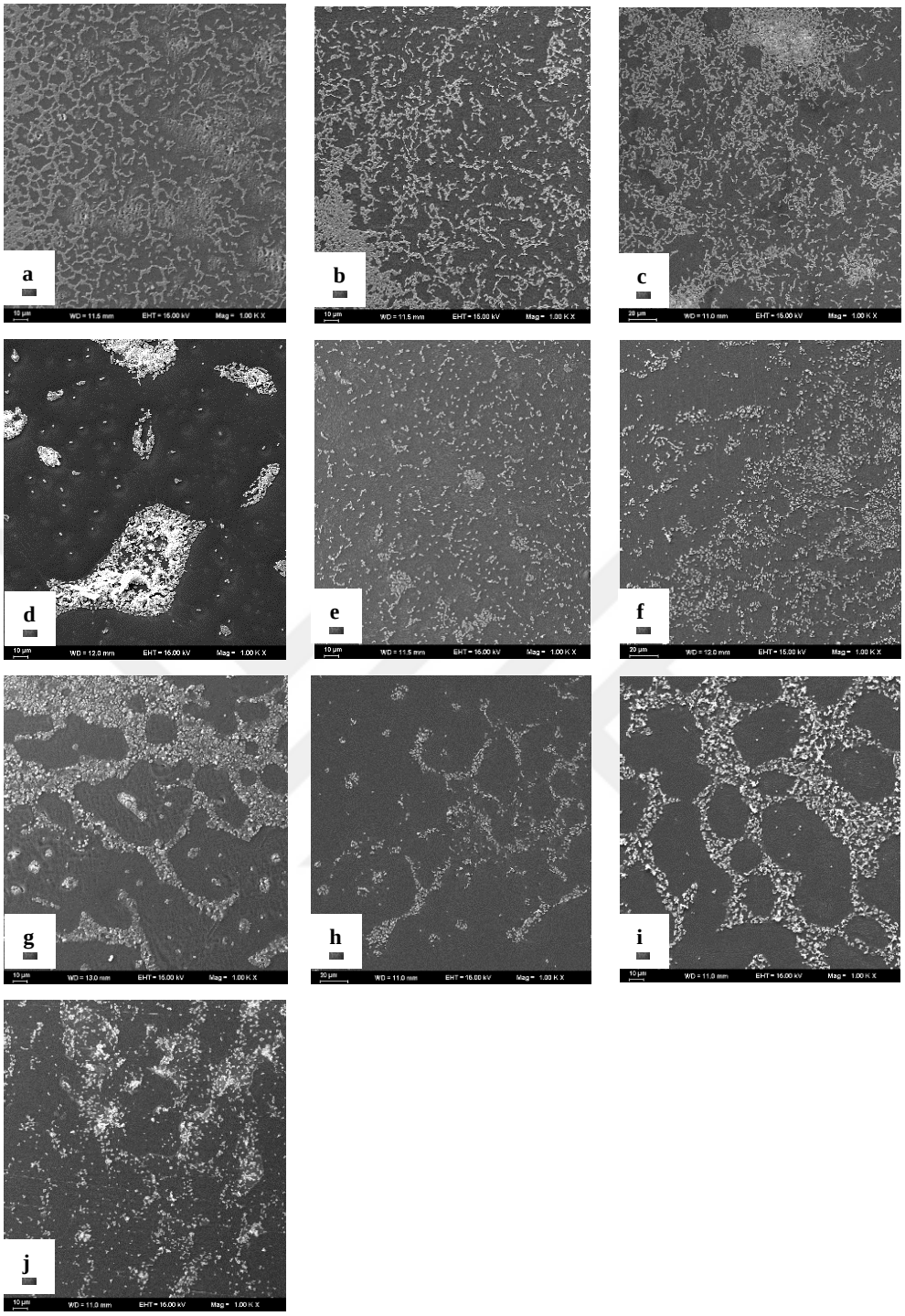
Antimikrobiyal Madde	Bakteri	Biyofilm düzeyi	Muamele sonrası biyofilm düzeyi
İmipenem + Sinnemaldehit	E1	+++	+++
	E3	+++	+++
	K1	+++	++
	K2	+++	+++
	K4	+	+
İmipenem + Timol	K1	+++	+++
	K2	+++	+++
	K4	+	+
	E1K1	+++	+++
	E3K3	+++	+++
Siprofloksasin + Kuersetin	E3	+++	+++
	K3	+++	+++
	K4	+	+
Siprofloksasin + Kurkumin	K4	+	+
Siprofloksasin + Ögenol	E1	+++	+++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	E4	+++	+++
	K1	+++	+++
	K2	+++	+++
	E1K1	+++	+++
	E2K2	+++	+++
	E3K3	+++	+++
	E4K4	+++	+++
Siprofloksasin + Sinnemaldehit	E1	+++	+++
	E2	+++	+++
	E3	+++	+++
	K2	+++	++
	K3	+++	+++
	K4	+	+
	E1K1	+++	+++
	E2K2	+++	+++
	E3K3	+++	+++
	E4K4	+++	+++

3.10.2. Biyofilmin Kateter Tutulumunun Önlenimi

Taramalı Elektron Mikroskobisi ile bakterilerin monomikrobiyal ve karma-tür biyofilm oluşumlarının herhangi bir antimikrobiyal ajan uygulanmadan, doğal oluşumlarına ait görüntüleri Şekil 3.24.' de ve kristal viyole yöntemi ile tespit edilen biyofilm inhibisyonlarının görüntüleri Şekil 3.25.' de sunulmuştur.



Şekil 3.24. Bakterilerin doğal biyofilm görüntüleri (a: E1, b: E2, c: E3, d: E4, e: K1, f: K2, g: K3, h: K4; i: E1K1, j: E2K2, k: E3K3, l: E4K4)



Şekil 3.25. Biyofilm oluşumunda azalma gözlemlenen örneklere ait SEM görüntüleri (a: Ampisilin+Sinnemaldehit – E1, b: Ampisilin+Sinnemaldehit – E1K1, c: Ampisilin+Sinnemaldehit E2K2, d: Ampisilin-Ögenol – K1, e: Siprofloksasin-Sinnemaldehit – K2, f: İmipenem-Timol – K1, g: İmipenem-Timol – K2, h: İmipenem-Sinnemaldehit – K1, i: İmipenem-Ögenol – K2, j: İmipenem-Ögenol – K3)

3.11. Metabolik Etkileşim Deney Sonuçları

3.11.1. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Antibakteriyel Aktivitesi

E. faecalis ATCC 29212' nin TSB ve s-SİB besiyerlerinde gelişimi sırasında ürettiği uçucu bileşenlerin *K. pneumoniae* ATCC 13883 üremesi üzerindeki etkisinin sonuçları kob/mL cinsinden değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

K. pneumoniae ATCC 13883' ün TSB ve s-SİB besiyerlerinde gelişimi sırasında ürettiği uçucu bileşenlerin *E. faecalis* ATCC 29212 üremesi üzerindeki etkisinin sonuçları kob/mL cinsinden değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

3.11.2. Bakterilerin Uçucu Bileşenlerinin Antibiyofilm Aktivitesi

E. faecalis ATCC 29212'nin TSB ve s-SİB besiyerlerinde gelişimi sırasında ürettiği uçucu bileşenlerin *K. pneumoniae* ATCC 13883 biyofilm gelişimi üzerindeki etkisinin sonuçları absorbans değeri cinsinden değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

K. pneumoniae ATCC 13883'ün TSB ve s-SİB besiyerlerinde gelişimi sırasında ürettiği uçucu bileşenlerin *E. faecalis* ATCC 29212 biyofilm gelişimi üzerindeki etkisinin sonuçları absorbans değeri cinsinden değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

3.11.3. Süpernatantların Antibakteriyel Aktivitesi

E. faecalis ATCC 29212 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883'ün hücresiz süpernatantlarının TSB ve s-SİB besiyerlerinde bir diğeri üzerindeki antibakteriyel etkisi sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirildiğinde; iki türün de herhangi bir inhibisyon aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir.

3.11.4. Metabolomik Analiz ile Laktik Asit Etkisinin Araştırılması

E. faecalis ATCC 29212 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883'ün ayrı ayrı ve karma-tür olarak TSB, TSB-g, s-SİB, s-SİB-g ortamlarında 16 ve 24 saatlik sürelerde geliştirilen biyofilmleri üzerinde yapılan metabolomik analizler sonucunda, ortamdaki laktik asit miktarları bakımından bir fark olup olmadığı değerlendirilmiştir.

TSB besiyerinde 16 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

TSB-g besiyerinde 16 saatlik inkübasyon sonucunda gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak 24 saatlik inkübasyon sonunda karma-tür ortamda *E. faecalis*'in monomikrobiyal kültürüne oranla 1,5 kat fazla laktik asit bulunduğu tespit edilmiştir.

s-SİB besiyerinde 16 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda hem monomikrobiyal ve karma tür, hem de 16 ve 24 saat arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Karma-tür ortamda 16 saatlik inkübasyon sonunda *E. faecalis*'in monomikrobiyal kültürüne oranla 1 kat fazla; 24 saatlik inkübasyon sonunda 1,3 kat fazla laktik asit bulunduğu tespit edilmiştir. Karma-tür ortamda 16 saatlik inkübasyon sonunda *K. pneumoniae'*nin monomikrobiyal kültürüne oranla 1,1 kat

fazla; 24 saatlik inkübasyon sonunda ise 2,6 kat az laktik asit bulunduğu tespit edilmiştir.

s-SİB-g besiyerinde 16 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda sadece *K. pneumoniae*'nin 16 saatlik inkübasyonda karma-tür kültürle arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. *E. faecalis* ile karma-tür biyofilm ortamındaki laktik asit miktarı hem 16, hem de 24 saatlik inkübasyon arasında anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Karma-tür ortamda 16 ve 24 saatlik inkübasyonlar sonunda *E. faecalis*'in monomikrobiyal kültürüne oranla 1,1 kat fazla; 24 saatlik inkübasyon sonunda *K. pneumoniae'*nin monomikrobiyal kültürüne oranla 1,3 kat fazla laktik asit bulunduğu tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Günümüzde, enfeksiyonların şiddeti ve direnci enfeksiyon kaynağı mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özellikleriyle direkt ilişkilidir. Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* ATCC 29212 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 suşlarının ve çeşitli izolatlarının biyofilm kapasitesi literatürde farklı çalışmalarda test edilmiş (Naparstek ve ark., 2014; Singh ve ark., 2019; Yadav ve ark., 2022; Zheng ve ark., 2018), deney gruplarında da oluşturdukları biyofilm kapasiteleri kristal viyole yöntemi ile test edilmiştir. Kristal viyole tekniğinin monomikrobiyal çalışmalarda yaygın şekilde kullanılması ve bu çalışmada da biyofilm oluşumunu açıkça göstermesi literatürle paralellik göstermektedir. Karma-tür biyofilm oluşumunda kısıtlı sayıdaki çalışmalarda Vazquez ve arkadaşları (2013) planktonik üretimde karışık kültürden elde edilen ısı akış-zaman eğrisinin *K. pneumoniae*'ninkiyle çok benzer olduğunu ve *E. faecalis*'inkinden önemli ölçüde farklı olduğunu; Galvan ve arkadaşları (2016) karma-tür ve monomikrbiyal biyofim gelişiminde üreme dinamiğinin benzer olduğunu; Mahdi ve arkadaşları (2020) insan kaynaklı bir izolattan elde edilen *E. faecalis*'in ürettiği yeni tanımlanan bir proteinöz enterosinin (enterosin GLHM) *K. pneumoniae* biyofilm oluşumunu önlediğini; Ballén ve arkadaşları (2020) glikozca zengin ortamda karma tür planktonik üretimde türler arasında herhangi bir baskılama olmadığını ancak 24 - 72 saatlik karma-tür biyofilmde *K. pneumoniae* üreme dinamiğinin monomikrobiyal biyofilm gelişimine oranla azalırken, *E. faecalis*'in kendi profiline benzer bir profil sergilediğini ve zaman içinde baskın tür haline geldiğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızsa 24 saatlik süre dâhilinde Galvan ve arkadaşlarının çalışması ile uyumlu olup, Ballén ve arkadaşlarının çalışmasında üç güne kadar sürdürülen aşamada *K. pneumoniae*'nin baskılanmasının zamanla belirginleştiğinin açıkça görülmesi sonuçlar arasındaki farkın deney süresinden ve kullanılan suşlara özgü özelliklerden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, deney sırasında elde edilen biyofilmlerin oluşum kapasiteleri ve içerikleri de literatürle desteklenmektedir.

Biyofilmin menşeeinin monomikrobiyal veya karma-tür olması ise en çok tartışılan konudur. Tez çalışmamızda elde edilen sonuçlar kapsamında, monomikrobiyal ve karma-tür biyofilm tutulumu arasında antimikrobiyallere yanıt bakımından herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir. Karma-türde, monomikrobyal kültürde daha az duyarlı olan türün değerlerine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Oysaki Lim ve arkadaşlarının (2013) keratitis üzerine yaptığı çalışmada karma-türde antibiyotik duyarlılığının azaldığı ve hastalık süresinin uzadığı; Pammi ve arkadaşlarının (2014) yenidoğanlarda dolaşım yolu enfeksiyonu üzerindeki araştırmasında karma-türde ölüm oranının arttığı; Jorge ve arkadaşlarının (2018) osteomiyelit vakalarını inceledikleri çalışmadaysa karma-tür enfeksiyonun ampütasyonla sonuçlanma oranının da arttığı şekilde daha ağır seyrettiği rapor edilmiştir. Bunun yanında, literatürde üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olan *P. aeruginosa* ve *S. aureus* karma-tür biyofilminde gelişim ve antimikrobiyallere duyarlılık bakımından her iki yönde de sonuçların gözlendiği çalışmalar mevcuttur (Filkins ve ark., 2015; Mitchell ve ark., 2010; Radlinski ve ark., 2017). Kart ve arkadaşlarının (2014) *S. aureus, P. aeruginosa* ve *C. albicans* karma-tür biyofilmine dezenfektanların etkisini araştırdıkları çalışmada ise tez çalışmasıyla paralel şekilde sonuç veren bulgulara rastlanmaktadır. Biyofilmi oluşturan türlerin etkisiyle farklı sonuçlar gözlenebildiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, monomikrobiyal ve karma-tür biyofilm oluşumunun tedaviye yanıt bakımından etkisinin türe, türün suşuna, biyofilmin mikro ve makro çevre koşullarına bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır.

Hastane enfeksiyonları arasında yaygın olarak görülen tıbbi cihaza bağlı olarak gelişen KİÜSE'de hem monomikrobiyal hem de karma-tür biyofilm gelişimi görülebilmektedir. Şimdiye dek farklı bakteriler tarafından meydana getirilebilen enfeksiyonlar ve enfeksiyonların seyri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Flores-Mireles ve ark., 2019; Kranz ve ark., 2020; Maharjan ve ark., 2018; Pelling ve ark., 2019). Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışmamızda KİÜSE'de yaygın olarak görülen *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* bakterilerinin monomikrobiyal ve karma-tür olarak kullanılması konu hakkında literatürde yer alan sınırlı sayıdaki çalışmaya katkı sağlamıştır.

Kronik evredeki enfeksiyonların çoğu zaman biyofilm ilişkili karma-tür olduğu fikri yaygınlaşmaktadır (Little ve ark., 2021). Mevcut antimikrobiyal ajanlar karma-tür enfeksiyonların tedavisinde etkili olsalar da, ÇİD özellikteki patojenlerin artışıyla bu enfeksiyonlarla mücadelenin ciddi şekilde zorlaşması beklenmektedir (Sartini ve ark., 2021). Her yıl dünya çapında 700.000 hasta antimikrobiyal direnç nedeniyle ölmektedir ve 2050 yılına kadar bu sayının 10 milyona çıkacağı öngörülmektedir (Ghosh ve ark., 2019). Bu da araştırmacıları yeni tedavi metotları ve yeni antimikrobiyal ajan/ajan kombinasyonları araştırmaya yönlendirmektedir. Ayrıca, antibiyotiklerle biyofilmlerin etkileşimlerine dair temel bilgilerdeki boşlukların da doldurulması gerekmektedir (Coenye ve ark., 2020).

Tez çalışması kapsamında etkinliğinin belirlenmesi hedeflenen bitkisel kökenli bileşenlerin monomikrobiyal ve karma-tür biyofilm üzerindeki etkilerinin ayrı ayrı test edilmelerinin yanı sıra, hâlihazırda kullanılmakta olan antibiyotiklerle eşleştirilerek sinerjik/antagonistik etkileşimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Birçok çalışmada alternatif antimikrobiyaller olarak göz önünde bulundurulan bitki kökenli bileşikler literatürde yeni çözüm kaynağı olarak önerilmektedir. Örneğin apigenin, mirisetin, resveratrol, kampferol, morin, sitrik asit, rozmarinik asit gibi bileşiklerinin etkileri çeşitli çalışmlarda gösterilmiştir (Bischof Vukušić ve ark., 2011; Ekambaram ve ark., 2016; Escandón ve ark., 2016; Nayaka ve ark., 2014; Taheri ve ark., 2020; Vestergaard ve ark., 2019; Yang ve ark. 2012).

Bitki kökenli bileşenlerden elde edilen antimikrobiyal etki sonuçlarımız monomikrobiyal kültürlerde *E. faecalis* için kurkumin ve sinnemaldehitin; *K. pneumoniae* için kurkumin, kuersetin ve sinnemaldehitin en etkili bileşenler olduğunu; karma-tür kültürde ise kurkumin, kuersetin ve sinnemaldehitin en etkili grup olarak antimikrobiyal etki bakımından yaklaşık seviyelerde dağılım gösterdiğini gözler önüne sermektedir. Kuersetinin *Porphyromas gingivalis* (He ve ark., 2020), *S. aureus* (Jing ve ark., 2022), *Salmonella enteritidis* (Nitiema ve ark., 2012), *P. aeruginosa* (Ouyang ve ark., 2016); kurkuminin *S. aureus* (Teow ve Ali, 2015), *S. mutans* (Li ve ark., 2018), *B. subtilis* (Negi ve ark., 1999), *E. coli* (Kaur ve ark., 2010), *H. pylori* (De ve ark., 2009), *P. aeruginosa* (Jaishwal ve Misra, 2018);

ögenolün *S. aureus* (Bezerra ve ark., 2022), *Mycobacterium tuberculosis* (de Almeida ve ark., 2019), *Vibrio parahaemolyticus* (Ashrafudoulla ve ark., 2020), *E. coli* (Jeyakumar ve Lawrence, 2021), *P. aeruginosa* (Lou ve ark., 2019); sinemmaldehitin *S. aureus* (Ferro ve ark., 2016), *M. tuberculosis* (Sawicki ve ark., 2018), *P. aeruginosa* (Utchariyakiat ve ark., 2016), *S. epidermidis* (Albano ve ark., 2019), *E. coli* (Pereira ve ark., 2021); timolün *S. aureus* (Sousa Silveira ve ark., 2020), *B. cereus* (Wang ve ark., 2022), *E. coli* (Zhang ve ark., 2022), *P. aeruginosa* (Liu ve ark., 2021), *H. pylori* (Grande ve ark., 2021) gibi farklı türlerden Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerindeki etkilerini rapor eden çalışmalar mevcuttur. Test ettiğimiz beş bitki kökenli madde için literatürde *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* bakterilerine monomikrobiyal kültürde etki değerleri çalışmamızla paralellik göstermektedir. Örneğin, kuersetinin *K. pneumoniae* için MİK değeri klinik izolatlarla yürütülen çeşitli çalışmalarda 40 – 512 µg/mL aralığında bulunmuş (Dey ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2019; Lin ve ark., 2021); % 67 saflıktaki kurkuminin *E. faecalis* için 293 µg/mL ve *K. pneumoniae* için 216 µg/mL değerlerinde antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiş (Güneş ve ark., 2016); ögenolün MİK değeri *K. pneumoniae* izolatları için 63 – 999 µg/mL aralığında (Dhara ve Tripathi, 2013) ve *E. faecalis* izolatları için 3200 µg/mL (Gowda ve ark., 2021) olarak tespit edilmiş; sinnemaldehitin *E. faecalis* örnekleri için MİK değeri 0,25 mg/mL olarak belirtilmiş (Ferro ve ark., 2016); timolün *K. pneumoniae* klinik izolatı için 0,703 mg/mL değerinde antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (El Atki ve ark., 2019). Test edilen bileşenlerin bu iki bakterinin karma-tür kültürü üzerindeki etkilerine dair bir veriye rastlanmamıştır. Çalışmamız literatüre bu konuda veri sunmaktadır. Bitki kökenli maddelerin bu geniş paneldeki mikroorganizma üzerindeki aktiviteleri reseptörler, iyon kanalları, enzimler ve metabolik yolaklar üzerindeki etkilerle ilişkilendirilmektedir.

Bitki kökenli fenolik bileşenlerin sınıflandırılmasında ele alınan özelliklere göre çeşitli altgruplar mevcuttur ve bu grupların ortak ya da ayırıcı bazı özellikleri etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır. Fenolik bileşiklerin oksidize bileşikler vasıtasıyla enzim aktivitesini inhibe ederek ya da proteinlerle kompleks oluşturduklarında hücre yüzey reseptörlerini kapatarak etki ettikleri;

fenolik bileşiklerden flavonoidlerin aktivitelerinin hücredışı çözünür proteinlerle kompleks oluşturduktan sonra hücre duvarına bağlanma özelliklerinden kaynaklandığı, lipofilik özellikleri arttıkça zar yapısını bozma kapasitelerinin de arttığı bilinmektedir (Perumal Samy ve Gopalakrishnakone, 2010). Kurkumin ve kuersetin de bu yolla antibakteriyel aktivite göstermektedir (Dadi ve ark, 2009; Das ve ark., 2019; He ve ark., 2020; Kaur ve ark., 2010; Lv ve ark., 2020; Tyagi ve ark., 2015). Sinnemaldehit, hücre zarının geçirgenliğini artırarak, hücre zarını oksitleyerek, sitoplazmik içeriğin yoğunlaşmasına neden olarak, hücre bölünmesini sekteye uğratarak, çoğunluğu algılama sistemi ve ATP/ATPaz üretimi gibi işlevleri inhibe ederek aktivite göstermektedir (Doyle ve Stephens, 2019; He ve ark., 2019). Ögenolün de içinde yer aldığı fenilpropanoid grubu olarak ele alındığındaysa, bu iki bileşen arasında sinnemaldehit belirgin derecede daha iyi metal iyon şelatörüdür (Sharma ve ark., 2016). Ögenol ve timol gibi terpenoidlerin aktivitesinde fenolik hidroksil gruplarının varlığı ve konumu dikkat çekmektedir (Álvarez-Martínez ve ark., 2021). Diğer fenolik bileşiklerdekine benzer şekilde, hidrofobik yapı zar fonksiyonunu bozmakta, zar lipit tabakasının konformasyonel yapısını değiştirmekte, ATP yoksunluğuna neden olmaktadır (Kachur ve Suntres 2020). Ancak terpenler ve fenilpropanoidler potasyum iyonlarının ekstravasasyonuna neden olmamaktadır (Nogueira ve ark., 2021). Komşu fonksiyonel grubun konumu ve özelliklerinin yanında, molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlama kapasitesi de benzer yapıdaki fenolik bileşikler arasındaki etkinlik düzeyinde belirleyici rol almaktadır. Örneğin, ögenol timole göre komşu eter gruplarıyla yaptığı hidrojen bağı nedeniyle, daha az moleküller arası hidrojen bağı yapmaktadır (Gallucci ve ark., 2009).

Bitki kökenli maddelerin antibakteriyel etki mekanizmasında göze çarpan ortak yol hücre zarı hasarıdır. Ancak polifenol flavonoidler zar üzerindeki akışkanlığı da değiştiriyorken, terpenler ve fenilpropanoidlerin bazı iyonların akış mekanizmasında etkili olmayışının; kurkumin ve kuersetinin sinnemaldehitten, onun da ögenol ve timolden daha etkili bulunmasına kısmen açıklık getirdiği düşünülmektedir. Sinnemaldehitin ögenole göre aktivitesinin daha yüksek olmasında metal iyonlarını daha iyi bağlamasının rolü olduğu tahmin edilmektedir. Ögenolün etki gösterdiği konsantrasyonun timolünkinden daha yüksek olması da, ögenolün moleküller arası

hidrojen bağı yapma kapsasitesinin daha düşük olmasının etkisiyle açıklanabilmektedir. Etki mekanizmalarının aydınlatılabilmesi ve etki düzeylerinin kendi aralarında açık bir derecelendirmesinin yapılabilmesi ancak hücre zarının işlevi için gerekli olan bileşenler ve hücre içi enzimatik faaliyetler üzerindeki etkilerinin ayrı ayrı analiz edileceği ileri çalışmalarla mümkün olacaktır.

Bitki kökenli maddelerin antibiyotik direnç profillerine dayalı olarak spesifik bakteri suşlarına karşı farklı antimikrobiyal aktiviteler sergilemesi (Atef ve ark., 2019), bitki kökenli bileşenlere dayalı uygulamalarda enfeksiyona neden olan bakterilerin gösterdiği antibiyotik direnç profiline bağlı olarak kişiselleştirilmiş tedavilerin tasarımına da kapı açmaktadır (Álvarez-Martínez ve ark., 2021).

Bitki kökenli bileşenlerin her ne kadar hem monomikrobiyal hem de karma-türde etki gösterdikleri açıkça gözlemlense de, alternatif antimikrobiyallerin destek amaçlı kullanımları antibiyotiklerle etkileşimlerinin test edilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda çeşitli yapısal gruplardan bileşenler test edilmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir (Bhattamisra ve ark., 2018; Buchmann ve ark., 2022; Saquib ve ark., 2019; Tagousop ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Bu gibi çalışmalarda, etki mekanizması bilinen antimikrobiyallerle eşleştirildiklerinde adjuvan olarak değerlendirilen sekonder metabolitler arasında polifenoller ve terpenler dikkat çeken gruplardır (Zacchino ve ark., 2017).

Tez çalışmamız kapsamında da ampisilin, imipenem ve siprofloksasin antibiyotikleri ile kuersetin, kurkumin, ögenol, sinnemaldehit ve timol bitki kökenli doğal maddelerin eşleştirmeleri kullanılmıştır.

Monomikrobiyal kültürde antimikrobiyal ajan kombinasyonları etki düzeyleri bakımından 4 farklı grupta toplanmıştır. Buna göre en yüksek etkiden düşüğe doğru sırasıyla “imipenem+ögenol”, “ampisilin+ögenol”, “siprofloksasin+ögenol” birinci grubu; “siprofloksasin+timol” ve “siprofloksasin+sinnemaldehit” ikinci grubu; “ampisilin+timol”, “ampisilin+kuersetin”, “imipenem+sinnemaldehit”, “ampisilin+sinnemaldehit”, “imipenem+timol”, “siprofloksasin+kuersetin”,

“siprofloksasin+kurkumin” üçüncü grubu; “ampisilin+kurkumin”, “imipenem+kurkumin” ve “imipenem+kuersetin” dördüncü grubu oluşturmaktadır. Gruplar arasında ortak geçiş kombinasyonları olmasının yanı sıra, dördücü grup tamamen etkisiz kombinasyonlardan oluşmaktadır. Halbuki bitkisel bileşenlerin tekli denemelerinden elde edilen sonuçlara göre kurkumin içeren kombinasyonların en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olacağı beklenmektedir. Hepsinde farklı düzeylerde sinerjik etki gözlense de, ögenolün tek başına en az etkili maddeyken her üç antibiyotik ile kombinasyonun en etkili grubu oluşturması dikkat çekmektedir. Bu noktada bitki kökenli maddelerin etki mekanizmasının henüz tam olarak aydınlatılamamış birden fazla yolla olmasının göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Ögenol tek başına uygulandığında hücre geçirgenliğini en etkin biçimde artırıyorken, farklı yollarla da desteklenen aktivitenin diğer bitki kökenli bileşenlere göre daha zayıf kalması; antibiyotiklerle birlikte uyguandığında ampisilin ve imipenemin peptidoglikan tabakasına etkimesinde ve florokinolonlardan siprofloksasinin hücre içine nüfuzunda en büyük desteği sağlamasıyla bu durumun ortaya çıktığı düşünülmektedir. Test edilen bakterilere özgü faktörlerden direnç mekanizmaları da eşleşmelerden alınacak yanıtları etkilemektedir. Ayrıca, bakterilerin metabolik özelliklerinin de etkisiyle, ortam pH’ında zamana bağlı değişimin kombinasyonların etkinliğine ne düzeyde etki edeceği de ayrıca araştırılmalıdır. Antimikrobiyal ajanların eşleştirilmesi bir yana, farklı türdeki iki bakterinin aynı ortamı paylaşmasının yarattığı fark da tabloya yansımaktadır. Karma-tür kültürde etki düzeyleri 2 grupta toplanmıştır. Buna göre “siprofloksasin+ögenol”, “ampisilin+ögenol” ve “ampisilin+sinnemaldehit” kombinasyonları daha etkili kombinasyonlar olarak tespit edilmiştir. En etkili gruplara baktığımızda monomikrobiyal kültürle benzr sonuçlar olduğu görülmektedir. Ampisilinle olan kombinasyonların ilksıralarda yer almasına ögenol ve sinnemaldehitin *K. pneumoniae* ampisilin direncini zayıflatabilmesinin etki ettiği düşünülmektedir.

Antimikrobiyal etki bakımından sinerjik etki gösteren kombinasyonların, biyofilm oluşumu üzerinde de daha yüksek etki göstereceği düşünülerek planlanan biyofilm inhibisyon deneylerinde, ögenol içeren antibiyotik kombinasyonlarının etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, biyofilm oluşumu üzerinde

sinnemaldehit içeren kombinasyonların da etki seviyesinin yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, etki mekanizmasının oluşumunda bitki kökenli bileşen açısıdan eşleştirilen antibiyotiğin ve suşun da önemli olduğu görülmektedir. Sonuçlarımıza benzer şekilde, belirli mikroorganizmalar üzerinde, antibiyotik-bitki kökenli doğal madde kombinasyonlarının farklı sonuçlar gösterdiği çalışmalar mevcuttur. Örneğin, ögenolün flukanazol, amfoterisin B ve azitromisin ile birlikte uygulanmasının *C. albicans* ve *S. mutans* karma-tür biyofilmi üzerine etkisi incelendiğinde; flukanazol ve azitromisin ile sinerjik etki tespit edilirken, amfoterisin B ile eşleştirilmesinin herhangi bir etki yaratmadığı gözlenmiştir (Jafri ve ark., 2020). Bir başka çalışmada, siprofloksasinin çeşitli bitki kökenli maddelerle etkileşiminin *S. aureus* biyofilmi üzerine etkisi araştırıldığında tetrasiklin ve morin eşleştirildiğinde suşa bağlı olarak sinerjik ya da antagonistik etki gözlendiği rapor edilmiştir (Abreu ve ark., 2016). Bu tür çalışmalardan elde edilen sonuçlar, etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar için temel veri oluşturmaktadır.

Antimikrobiyal etki mekanizması henüz tam olarak açıklanamamış olan bitki kökenli bileşenlerin uygulandıkları mikrobiyal kültürlerdeki metabolitlerle etkileşimleri de kaçınılmazdır. Nitrojen, gliserolipid, aminoasit ve karbonhidrat metabolik yolakları gibi çeşitli yolaklar biyofilm oluşum mekanizması üzerine etki etmektedir (Crabbé ve ark., 2019; Isom ve ark., 2022; Lu ve ark., 2019; Rinaldo ve ark., 2018; She ve ark., 2019).

Galvan ve arkadaşları (2016) sentetik idrar besiyerinde *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* karma-tür biyofilminde etkileşimin nötral olduğunu; Ballén ve arkadaşları (2020) ise insan idrarı ortamında etkileşimin nötral olduğunu ancak glikoz destekli insan idrarı ortamında baskın türün *E. faecalis* olduğunu belirtmiş, 24 saat ve sonrasında gözlenen sürelerde baskılayıcı faktörün laktik asit olabileceğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda TSB, TSB-g, s-SİB ve s-SİB-g besiortamında aradaki etkileşimin 16 ve 24 saatlik üretimde nötral olduğu gözlenmiştir. Sonuçlarımız Galvan ve arkadaşları ile benzerlik göstermektedir. Ballén ve arkadaşları ile aradaki farkın ölçüm yapılan zaman aralıkları, kullanılan suşlar ve

besiortamı özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her üç çalışmada iki türün de test süreleri boyunca biyofilm içinde canlılığını sürdürdüğü görülmektedir. Bu da *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* karma-tür biyofilmine rastlandığında tedavi seçenekleri değerlendirilirken her iki türe etki edecek seçeneklerin dikkate alınması gerektiğine işaret etmektedir.

Tez çalışmamızda laktik asit miktarlarını değerlendirdiğimizde, Ballén ve arkadaşlarına (2020) benzer şekilde, glikozca zengin besiyerinde ortamdaki laktik asit miktarının arttığı tespit edilmiştir. Deney sürelerini de dikkate aldığımızdaysa, TSB-g besiortamında 16 saat için bir fark gözlenmeyip, sadece 24 saat verilerinde farkın ortaya çıkması deney koşullarının sonuçlara etkisini vurgulamaktadır. Ayrıca diğer çalışmada inkübasyonun ilk sekiz saatinde bir baskılama olmayıp, 24'üncü saat ve sonraki zaman dilimlerinde *E. faecalis*'in daha baskın hale gelmesi durumuna da açıklayıcı veri desteği sağlamaktadır. Diğer yandan, karma-tür biyofilmde 24 saatlik inkübasyon sonunda s-SİB ortamında *K. pneumoniae* monomikrobiyal biyofilmine oranla 2,6 kat az laktik asit gözlenirken, s-SİB-g ortamında 1,3 kat fazla laktik asit gözlenmesi; besiyeri içeriğinin bakterilerin metabolik faaliyetleri üzerindeki etkisine işaret etmektedir. Glikozun *E. faecalis* laktik asit üretimini indükleyici etkisi ortadan kalktığında, idrar ortamında metabolik faaliyet dengesi değişmektedir. Bu durumun gerekçeleriyle açıklanabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Metabolomik analiz ile laktik asit miktar verilerinin bütününe baktığımızda, ortamdaki laktik asit miktarının bu karma-tür biyofilm yapısında etkili faktörlerden olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç mikrobiyal üreme ortamındaki maddelerin antimikrobiyal aktiviteyi artırıcı/azaltıcı etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Antimikrobiyal madde uygulamalarının laktik asit içeren ortamda denenmesi ileri çalışmalar için bir altyapı oluşturabilecektir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bitki kökenli doğal maddelerin monomikrobiyal ve karma-tür kültürleri ile biyofilm oluşumu üzerinde tek tek ve antibiyotik destekli olarak etkili olabileceklerini göstermektedir. Ancak bitki kökenli bileşenlerin etki mekanizması, moleküler ve metabolik yolakları hakkında daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* karma-tür biyofilmindeki bazı metabolik etkileşimler ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden ampisilin, imipenem ve siprofloksasinin bitki kökenli doğal maddelerden kurkumin, kuersetin, ögenol, sinnemaldehit ve timol ile birlikte kullanımının bu karma-tür biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda etkili eşleştirilmeler saptanarak amaca ulaşılmıştır.

Antimikrobiyal etki sonuçlarımıza göre monomikrobiyal kültürlerde *E. faecalis* için kurkumin ve sinnemaldehit; *K. pneumoniae* için kurkumin, kuersetin ve sinnemaldehit en etkili bileşenler; karma-tür kültürde ise kurkumin, kuersetin ve sinnemaldehit en etkili grup olarak tespit edilmiştir. Monomikrobiyal kültürde antimikrobiyal ajan kombinasyonları etki düzeyleri bakımından 4 farklı grupta toplanmıştır. Ögenolün her üç antibiyotikle kombinasyonu en etkili grubu oluştururken, sinnemaldehit ve timol sonraki gruplarda yer almıştır. Kurkumin ve kuersetin ise kombinasyonda ya çok zayıf ya da etkisiz bulunmuştur. Karma-tür kültürde de ögenol ve sinnemaldehit kombinasyonları daha etkili olarak tespit edilmiştir. Biyofilm inhibisyonu deneylerinde de olumlu sonuçlar ögenol ve sinnemaldehit kombinasyonlarında görülmüştür. Bu iki madde için sonuçlar ileri çalışmalarda değerlendirilmeleri bakımından tatmin edici sonuçlardır.

Metabolik etkileşim deneylerinde iki türün 24 saatlik sürede nötral etkileşimde olduğu, aralarındaki etkileşimde rolü olduğu düşünülen laktik asitin biyofilmdeki miktarının besiortamı özelliklerine göre değiştği ve glikoz içeren ortamlarda daha fazla olduğu tespit edilmştir.

Sonuçların değerlendirilmesinin ardından, ögenol ve sinnemaldehitin hem saf formları hem de antibiyotiklerle kombinasyonları üzerinde biyouyumlu ve aktivitelerini artıracak formülasyonların geliştirilmesi, bu formülasyonların etkinliğinin çeşitli ortam koşullarında araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Monomikrobiyal ve Karma-tür Biyofilm Oluşumu Üzerine Antimikrobiyal Ajanların Sinerjik Etkilerinin Araştırılması

Binlerce yıldır doğada ya da hastane ortamları gibi insan müdahalesinin yoğun olduğu yerlerde insanlarla çeşitli etkileşimler içinde varlığını sürdüren mikroorganizmaların konakçılarıyla ilişkili oluşturdukları biyofilmler, enfeksiyonların da yaklaşık %65-80' inden sorumlu tutulmaktadır. Biyofilmlerde rekalsitrans tedavi seçeneklerini sınırlandırmakta, tedavi sürecini zorlaştırmaktadır. Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonları dünya genelinde en sık rastlanan gruptur ve bu grup içinde karma-tür tutulum oranı %80'in üzerindedir. Üriner kateterizasyonda idrar gibi besleyici bir ortamda gelişen bakteriyel kolonizasyon potansiyel antibiyotiğe dirençli bakteri kaynağı olarak sağlık hizmetleri sistemi için büyük maliyetler oluşturmaktadır. Birden fazla türün oluşturduğu karma-tür biyofilmlerde heterojenliğin enfeksiyon süreçlerine etkisi üzerine araştırmalar ağırlık kazanmaktadır. *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* karma-tür biyofilmi üriner sistem ilişkili kateterlerde gözlenmektedir. Çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* türlerinin karma-tür biyofilm içindeki metabolik etkileşimleri ve seçilen antibiyotiklerin bazı bitki kökenli biyoaktif bileşenlerle kombinasyonunun bu biyofilm üzerine antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, nefroloji kliniğinde yatan kateterize hastalardan rutin muayenede alınan örneklerden *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* izolatları toplanmış, direnç profilleri çıkarılmış, biyofilm kapasiteleri belirlenmiştir. Aralarından 3'er klinik izolat ile, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart suşları üzerinde antibiyotiklerin (ampisilin, siprofloksasin ve imipenem) ve bitki kökenli doğal maddelerin (kuersetin, kurkumin, ögenol, sinnemaldehit ve timol) hem monomikrobiyal hem de karma-tür kültürlerde MİK değerleri belirlenmiş, damatahtası yöntemi ile monomikrobiyal ve karma-tür kombinasyon çalışmaları yürütülmüştür. Ardından sinerjik veya aditif etki gözlenen kombinasyonlar tespit edilerek, bunların sub-MİK konsantrasyonlarında hem zamana bağlı ölüm grafikleri çıkarılmış, hem de biyofilm oluşumunun önlenimi kristal viyole yöntemiyle test edilmiştir. Biyofilm oluşumunu azalttığı gözlemlenen kombinasyonlar için SEM görüntüleri alınarak sonuçlar desteklenmiştir. Ayrıca, TSB besiyeri ve s-SİB besiyerlerinde süpernatantın antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi, uçucu metabolitlerin antibiyofilm etkisi ve GS-MS ile hedeflendirilmemiş metabolomik analizle laktik asitin karma-tür kültüre etkisi araştırılmıştır. Sadece *K. pneumoniae* ATCC 13883'ün zayıf, diğerlerinin kuvvetli biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Karma-tür kültüründe iki türün monomikrobiyal kültürasyona benzer üreme grafiği elde edilmiştir. Kombinasyonların çalışmalarında etki düzeyi en yüksek grupta ögenolün her üç antibiyotikle kombinasyonları yer almış, ampisilin ve imipenemin kurkuminle ve imipenemin kursetinle kombinasyonları etkisiz bulunmuştur. Biyofilm inhibisyon deneylerinde ampisilin+sinnemaldehit, ampisilin+ögenol, siprofloksasin+sinnemaldehit, imipenem+sinnemaldehit, imipenem+ögenol kombinasyonlarının biyofilm kapasitesini düşürebildiği gözlenmiştir. Metabolik etkileşim deneylerinde süpernatantların ve uçucu bileşenlerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin olmadığı, besiortamının laktik asit üretim miktarını etkilediği ve glikoz içeren ortamlarda daha fazla üretildiği anlaşılmıştır. Çalışmadan elde edilen verilerin son dönemin dikkat çeken *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* karma-tür biyofilm içindeki metabolik etkileşimlerinin aydınlatılmasına ve bu biyofilmin oluşumunu önlemek için alternatif antibiyofilm ajanı/ajan kombinasyonu belirlemeye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, Karma-tür biyofilm, Metabolomik

SUMMARY

Investigation of Synergistic Effects of Antimicrobial Agents on Monomicrobial and Polymicrobial Biofilm Formation

Biofilms formed by microorganisms, which have existed in various interactions with humans in nature or in places where human intervention is intense, such as hospital environments for thousands of years, are responsible for approximately 65-80% of infections. Recalcitrance in biofilms limits treatment options and complicates the treatment process. Among the nosocomial infections, catheter-related urinary tract infections are the most common group worldwide, and the rate of mixed-type involvement is over 80% in this group. Bacterial colonization that develops in a nutrient medium such as urine in urinary catheterization poses great costs to the healthcare system as a potential source of antibiotic-resistant bacteria. Studies on the effect of heterogeneity on infection processes in mixed-species biofilms formed by more than one species are gaining importance. *K. pneumoniae* and *E. faecalis* mixed-species biofilm colonization has been observed in urinary tract associated catheters. In our study, the metabolic interactions of *K. pneumoniae* and *E. faecalis* species, in mixed-species biofilm and the antibacterial and antibiofilm effects of the combination of selected antibiotics, with some plant-derived bioactive components on this biofilm were investigated. For this purpose, *E. faecalis* and *K. pneumoniae* isolates were collected from the samples taken during routine examination from catheterized patients in the nephrology clinic, resistance profiles were determined, and biofilm capacities were determined. MIC values of antibiotics (ampicillin, ciprofloxacin and imipenem) and plant-derived natural substances (quercetin, curcumin, eugenol, cinnemaldehyde and thymol) were determined on 3 clinical isolates and *E. faecalis* ATCC 29212 and *K. pneumoniae* ATCC 13883 standard strains, combination studies were carried out with the checkerboard method. Combinations with synergistic or additive effects were selected and both time-dependent mortality graphs were drawn at sub-MIC concentrations, the inhibition of biofilm formation was tested with the crystal violet method. The results were supported by taking SEM images for the combinations observed to reduce biofilm formation. In addition, the antimicrobial and the antibiofilm effect of the supernatant, the antibiofilm effect of volatile metabolites, and the effect of lactic acid on mixed-species culture by non-targeted metabolomic analysis with GS-MS were investigated in TSB and s-SIB media. It was observed that only *K. pneumoniae* formed a weak biofilm, while the others formed a strong biofilm. In the mixed-species culture, the growth charts of the two species were obtained similar to the monomicrobial culture. When the effect of the combinations was compared, 5 subgroups were formed according to the effect level. Accordingly, the combinations of eugenol with ampicillin, imipenem and ciprofloxacin were found in the group with the highest efficacy, and the combinations of ampicillin and imipenem with curcumin and imipenem with quercetin were found to be ineffective. In biofilm inhibition experiments, it was observed that ampicillin+cinnemaldehyde, ampicillin+eugenol, ciprofloxacin+cinnemaldehyde, imipenem+cinnemaldehyde, imipenem+eugenol combinations could reduce the biofilm capacity. No inhibition was observed with treatment at lower concentrations. In the metabolic interaction experiments, it was understood that the supernatants and volatile components did not have antimicrobial and antibiofilm effects, the medium used for production and affected the amount of lactic acid production and produced more in glucose supplemented environments. It is thought that the data obtained from the study will contribute to the elucidation of the metabolic interactions of *K. pneumoniae* and *E. faecalis* mixed-species biofilms and to determine alternative antibiofilm agent/agent combination to prevent the formation of this biofilm.

Keywords: *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, Metabolomics, Mixed-species biofilm

KAYNAKLAR

ABDULRAHMAN H, MISBA L, AHMAD S, KHAN AU (2020). Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of Pseudomonas aeruginosa: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **30**: 101645.

ABREU AC, SAAVEDRA MJ, SIMÕES LC, SIMÕES M (2016). Combinatorial approaches with selected phytochemicals to increase antibiotic efficacy against Staphylococcus aureus biofilms. *Biofouling*, **32**(9), 1103-1114.

ACHTMAN M (2016). How old are bacterial pathogens?. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **283**(1836): 20160990.

ADEYEMI OS, OBEME-IMOM JI, AKPOR BO, ROTIMI D, BATIHA GES, OWOLABI A (2020). Altered redox status, DNA damage and modulation of L-tryptophan metabolism contribute to antimicrobial action of curcumin. *Heliyon*, **6**(3): e03495. Doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03495

ALBANO M, CRULHAS BP, ALVES FCB, PEREIRA AFM, ANDRADE BFMT, BARBOSA LN, FURLANETTO A, LYRA LPS, RALL VLM, JÚNİOR AF (2019). Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against S. epidermidis. *Microbial Pathogenesis*, **126**: 231-238.

ALUANI D, TZANKOVA V, YORDANOV Y, ZHELYAZKOVA A, GEORGIEVA E, YONCHEVA K (2016). Quercetin: An overview of biological effects and recent development of drug delivery systems. *Pharmacia*, **63**(4): 52-60.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ FJ, BARRAJÓN-CATALÁN E, HERRANZ-LÓPEZ M, MİCOL V (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, **90**: 153626.

AMBROSIONI J, HERNANDEZ-MENESES M, TÉLLEZ A, PERICÀS J, FALCES C, TOLOSANA JM, VIDAL B, ALMELA M, QUINTANA E, LIOPIS J, MORENO A, MIRO JM (2017). The changing epidemiology of infective endocarditis in the twenty-first century. *Current Infectious Disease Reports*, **19**(5): 1-10.

ANTONELLI G, CAPPELLI L, CINELLI P, CUFFARO R, MANCA B, NICCHI S, TONDI S, VEZZANI G, VIVIANI V, DELANY I, SCARSELLI M, SCHIAVETTI F (2021). Strategies to Tackle Antimicrobial Resistance: The Example of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(9): 4943.

ARMBRUSTER CE, HONG W, PANG B, WEIMER KE, JUNEAU RA, TURNER J, SWORDS WE (2010). Indirect pathogenicity of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. *MBio*, **1**(3): e00102-10. Doi:10.1128/mBio.00102-10

ARMBRUSTER CE, SMITH SN, YEP A, MOBLEY HL (2014). Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during Proteus mirabilis and Providencia stuartii coinfection due to synergistic induction of urease activity. *The Journal of Infectious Diseases*, **209**(10): 1524-1532.

ARZMI MH, CIRILLO N, LENZO JC, CATMULL DV, O'BRIEN-SIMPSON N, REYNOLDS EC, Dashper S, McCULLOUGH M (2019). Monospecies and polymicrobial biofilms differentially regulate the phenotype of genotype-specific oral cancer cells. *Carcinogenesis*, **40**(1): 184-193.

ASHRAFUDOULLA M, MIZAN MFR, HA AJW, PARK SH, HA SD (2020). Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance Vibrio parahaemolyticus. *Food Microbiology*, **91**: 103500.

ATEF NM, SHANAB SM, NEGM SI, ABBAS YA (2019). Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. *Bulletin of the National Research Centre*, **43**(1), 1-11.

AUSTRIAN R (1960). The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, and historical note. *Bacteriological Reviews*, **24**(3): 261.

AZEREDO J, AZEVEDO NF, BRIANDET R, CERCA N, COENYE T, COSTA AR, DESVAUX M, BONAVENTURA G, HÉBRAUD M, JAGLIC Z, KAČÁNIOVÁ M, KNØCHEL S, LOURENÇO A, MERGULHÃO F, MEYER RL, NYCHAS G, SIMÕES M, TRESSE O, STERNBERG C (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, **43**(3): 313-351.

AZEVEDO AS, ALMEIDA C, MELO LF, AZEVEDO NF (2017). Impact of polymicrobial biofilms in catheter-associated urinary tract infections. *Critical Reviews in Microbiology*, **43**(4): 423-439.

BAGALI S, MANTUR PG (2021). Bacteriological Profile of Catheter Associated Urinary Tract Infection and its Antimicrobial Susceptibility Pattern in a Tertiary Care Hospital. *International Journal of Health and Clinical Researc*h, **4**(22): 268-271

BAI F, CAI Z, YANG L (2019). Recent progress in experimental and human disease-associated multi-species biofilms. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **17**: 1234-1244.

BAIDYA S, SHARMA S, MISHRA SK, KATTEL HP, PARAJULI K, SHERCHAND JB (2021). Biofilm formation by pathogens causing ventilator-associated pneumonia at intensive care units in a tertiary care hospital: an armor for refuge. *BioMed Research International*, **2021**: 8817700. Doi:10.1155/2021/8817700

BAIR KL, SHAFIRSTEIN G, CAMPAGNARI AA (2020). In vitro Photodynamic Therapy of Polymicrobial Biofilms Commonly Associated with Otitis Media. *Frontiers in Microbiology*, **11**: 558482.

BALAURE PC, GRUMEZESCU AM (2020). Recent advances in surface nanoengineering for biofilm prevention and control. Part I: molecular basis of biofilm recalcitrance. Passive anti-biofouling nanocoatings. *Nanomaterials*, **10**(6): 1230.

BALLÉN V, RATIA C, CEPAS V, SOTO SM (2020). Enterococcus faecalis inhibits Klebsiella pneumoniae growth in polymicrobial biofilms in a glucose-enriched medium. *Biofouling*, **36**(7): 846-861.

BANSAL K, CHAUDHARY R, MATHUR VP, TEWARI N (2020). Comparison of oral micro-flora in caries active and caries free Indian children using culture techniques and PCR analysis. *Indian Journal of Dental Research*, **31**(3): 420.

BARBIERI R, COPPO E, MARCHESE A, DAGLIA M, SOBARZO-SÁNCHEZ E, NABAVI SF, NABAVI SM (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, **196**: 44-68.

BAR-ON YM, PHILLIPS R, MILO R (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(25): 6506-6511.

BARRASSO K, WATVE S, SIMPSON CA, GEYMAN LJ, van KESSEL JC, NG WL (2020). Dual-function quorum-sensing systems in bacterial pathogens and symbionts. *PLoS Pathogens*, **16**(10), e1008934. Doi:10.1371/journal.ppat.1008934

BEKKER T, GOVIND A, WEBER DM (2019). A case of polymicrobial, gram-negative pulmonic valve endocarditis. *Case reports in infectious diseases*, **2019**: 6439390.

BELAS R (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, **22**(9): 517-527.

BENGOECHEA JA, PESSOA JSA (2019). Klebsiella pneumoniae infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, **43**(2): 123-144.

BERGER D, RAKHAMIMOVA A, POLLACK A, LOEWY Z (2018). Oral biofilms: Development, control, and analysis. *High-throughput*, **7**(3): 24.

BERNARDI S, ANDERSON A, MACCHIARELLI G, HELLWIG E, CIEPLIK F, VACH K, AL-AHMAD A (2021). Subinhibitory Antibiotic Concentrations Enhance Biofilm Formation of Clinical Enterococcus faecalis Isolates. *Antibiotics*, **10**(7): 874.

BEZERRA SR, BEZERRA AH, de SOUSA SILVEIRA Z, MACEDO NS, dos SANTOS BARBOSA CR, MUNIZ DF, dos SANTOS JFS, COUTINHO HDM da CUNHA FAB (2022). Antibacterial activity of eugenol on the IS-58 strain of Staphylococcus aureus resistant to tetracycline and toxicity in Drosophila melanogaster. Microbial Pathogenesis, **164**: 105456.

BHATTAMISRA SK, KUEAN CH, CHIEH LB, YAN VL Y, LEE CK, HOOI LP, SHYAN LP, LIEW YK, CANDASAMY M, SAHU PS (2018). Antibacterial activity of geraniol in combination with standard antibiotics against Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Helicobacter pylori. *Natural Product Communications*, **13**(7): 791-793.

BILGEHAN H (2009). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Baskı, Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları.

BISCHOF VUKUŠIĆ S, FLINČEC GRGAC S, BUDIMIR A, KALENIĆ S (2011). Cotton textiles modified with citric acid as efficient antibacterial agent for prevention of nosocomial infections. *Croatian Medical Journal*, **52**(1), 68-75.

BORGES A, ABREU AC, DIAS C, SAAVEDRA MJ, BORGES F, SIMÕES M (2016). New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*, **21**(7): 877. Doi :10.3390/molecules21070877

BOULETREAU S, GARABETIAN F, SAUVAGE S, SÁNCHEZ-PÉREZ JM (2006). Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology*, **51**(5), 901-912.

BRAGA PC, DAL SASSO M, CULICI M, SPALLINO A (2010). Inhibitory activity of thymol on native and mature Gardnerella vaginalis biofilms: ın vitro study. *Arzneimittelforschung*, **60**(11): 675-681.

BRISSE S, GRIMONT F, GRIMONT PAD (2006). The Genus Klebsiella. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY

BROOK I, HUNTER V, WALKER RI (1984). Synergistic effect of bacteroides, clostridium, fusobacterium anaerobic cocci and aerobic bacteria on mortality and induction of subcutaneous abscesses in mice. *Journal of Infectious Diseases*, **149**(6): 924-928.

BROOKS AN, TURKARSLAN S, BEER KD, YIN LO F, BALIGA NS (2011). Adaptation of cells to new environments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **3**(5): 544-561.

BUCH PJ, CHAI Y, GOLUCH ED (2019). Treating polymicrobial infections in chronic diabetic wounds. *Clinical Microbiology Reviews*, **32**(2): e00091-18. Doi:10.1128/CMR.00091-18

BUCHMANN D, SCHULTZE N, BORCHARDT J, BÖTTCHER I, SCHAUFLER K, GUENTHER S (2022). Synergistic antimicrobial activities of epigallocatechin gallate, myricetin, daidzein, gallic acid, epicatechin, 3-hydroxy-6-methoxyflavone and genistein combined with antibiotics against ESKAPE pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, **132**(2): 949-963.

CARTHEY AJ, BLUMSTEIN DT, GALLAGHER RV, TETU SG, GILLINGS MR (2020). Conserving the holobiont. *Functional Ecology*, **34**(4): 764-776.

CASTELLANI C, ASSAEL BM (2017). Cystic fibrosis: a clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **74**(1): 129-140.

CH'NG JH, CHONG KK, LAM LN, WONG JJ, KLINE KA (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, **17**(2): 82-94.

CHANDRA H, BISHNOI P, YADAV A, PATNI B, MISHRA AP, NAUTIYAL AR (2017). Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review. *Plants*, **6**(2): 16.

CHAVEZ-DOZAL AA, NOURABADI N, ERKEN M, McDOUGALD D, NISHIGUCHI MK (2016). Comparative analysis of quantitative methodologies for Vibrionaceae biofilms. *Folia Microbiologica*, **61**(6): 449-453.

CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, BISNO AL, & BEACHEY EH (1982). Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, **37**(1): 318-326.

CIOFU O, ROJO MOLINERO E, MACIÀ MD, OLIVER A (2017). Antibiotic treatment of biofilm infections. *Apmis*, **125**(4): 304-319.

CLARKE E (2016). Levels of selection in biofilms: multispecies biofilms are not evolutionary individuals. *Biology & Philosophy*, **31**(2): 191-212.

CLEGG S, MURPHY CN (2016). Epidemiology and virulence of Klebsiella pneumoniae. *Microbiology Spectrum*, **4**(1): 1-4.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-784-7). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

COENYE T, KJELLERUP B, STOODLEY P, BJARNSHOLT T (2020). The future of biofilm research–Report on the '2019 Biofilm Bash'. *Biofilm*, **2**: 100012.

COSTA LG, GARRICK JM, ROQUÈ PJ, PELLACANI C (2016). Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, **2016**: 1-10.

COSTERTON JW, GEESEY GG, CHENG KJ (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, **238**(1): 86-95.

CRABBÉ A, JENSEN PØ, BJARNSHOLT T, COENYE T (2019). Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms. *Trends in Microbiology*, **27**(10): 850-863.

DADI PK, AHMAD M, AHMAD Z (2009). Inhibition of ATPase activity of Escherichia coli ATP synthase by polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, **45**(1): 72-79.

d'ANDREA MM, LAU GW (2020). DNABII targeting antibodies as vaccines against biofilm diseases. *EBioMedicine*, **58**: 102921.

DAS S, BATRA S, GUPTA PP, KUMAR M, SRIVASTAVA VK, JYOTI A, Singh N, KAUSHIK, S. (2019). Identification and evaluation of quercetin as a potential inhibitor of naphthoate synthase from Enterococcus faecalis. *Journal of Molecular Recognition*, **32**(11): e2802. Doi:10.1002/jmr.2802

de ALMEIDA AL, CALEFFI-FERRACIOLI KR, de L SCODRO RB, BALDIN VP, MONTAHOLI DC, SPRICIGO LF, NAKAMURA-VASCONCELOS SS, HEGETO LA, SAMPIRON EG, COSTACURTA GF, YAMAZAKI DAS, GAUZE GF, SIQUEIRA VLD, CARDOSO RF (2019). Eugenol and derivatives activity against Mycobacterium tuberculosis, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. *Future Microbiology*, **14**(4): 331-344.

DE OLIVEIRA RVD, BONAFÉ FSS, SPOLIDORIO DMP, KOGA-ITO CY, DE FARIAS AL, KIRKER KR, JAMES GA, BRIGHENTI FL (2020). Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii interaction in dual-species biofilm. *Microorganisms*, **8**(2): 194.

De R, KUNDU P, SWARNAKAR S, RAMAMURTHY T, CHOWDHURY A, NAIR GB, MUKHOPADHYAY AK (2009). Antimicrobial activity of curcumin against Helicobacter pylori isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(4): 1592-1597.

DEJEA CM, FATHI P, CRAIG JM, BOLEIJ A, TADDESE R, GEIS AL, WU X, SHIELDS CED, HECHENBLEIKNER EM, HUSO DL, ANDERS RA, GIARDIELLO FM, WICK EC, WANG H, WU S, PARDOLL DM, HOUSSEAU F, SEARS CL (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*, **359**(6375): 592-597.

DEVRIESE LA, POT B (1995). The genus enterococcus. In *The genera of lactic acid bacteria*, 327-367, Springer, Boston, MA.

DEY D, GHOSH S, RA, R, HAZRA B (2016). Polyphenolic Secondary Metabolites Synergize the Activity of Commercial Antibiotics against Clinical Isolates of β-Lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. *Phytotherapy Research*, **30**(2): 272-282.

DHARA L, TRIPATHI A (2013). Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis. *European Journal of Integrative Medicine*, **5**(6): 527-536.

DHARA L, TRIPATHI A (2020). Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **39**(1): 65-73.

DIAZ PI, VALM AM (2020). Microbial interactions in oral communities mediate emergent biofilm properties. *Journal of Dental Research*, **99**(1): 18-25.

DIEKEMA DJ, HSUEH PR, MENDES RE, PFALLER MA, ROLSTON KV, SADER HS, JONES RN (2019). The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63**(7): e00355-19. Doi:10.1128/AAC.00355-19

DJERIBI R, BOUCHLOUKH W, JOUENNE T, MENAA B (2012). Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control*, **40**(9): 854-859.

DOMADIA P, SWARUP S, BHUNIA A, SIVARAMAN J, DASGUPTA D (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, **74**(6): 831-840.

DONLAN RM (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, **7**(2): 277.

DONLAN RM, COSTERTON JW (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 167–193.

DOYLE AA, STEPHENS JC (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, **139**: 104405. Doi:10.1016/j.fitote.2019.104405

DRIFFIELD K, MILLER K, BOSTOCK JM, O'NEILL AJ, CHOPRA I (2008). Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**(5): 1053-1056.

DUNNE Jr WM (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 155–166.

DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ (DSÖ) raporu, Chair: E. Tacconelli and N. Magrini (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Who 2017*, 2017:1-7.

EKAMBARAM SP, PERUMAL SS, BALAKRISHNAN A, MARAPPAN N, GAJENDRAN SS, VISWANATHAN V (2016). Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, **5**(4): 358.

EL ATKI Y, AOUAM I, EL KAMARI, F, TAROQ A, GOURCH A, LYOUSSI B, ABDELLAOUI, A (2019). Antibacterial efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **11**(2): 306-309.

ELLEPOLA K, TRUONG T, LIU Y, LIN Q, LIM TK, LEE YM, CAO T, KOO H, SENEVIRATNE CJ (2019). Multi-omics analyses reveal synergistic carbohydrate metabolism in Streptococcus mutans-Candida albicans mixed-species biofilms. *Infection and Immunity*, **87**(10): e00339-19. Doi:10.1128/IAI.00339-19

ESCANDON RA, Del CAMPO M, LOPEZ-SOLIS R, OBREQUE-SLIER E, TOLEDO H (2016). Antibacterial effect of kaempferol and (−)-epicatechin on Helicobacter pylori. *European Food Research and Technology*, **242**(9): 1495-1502.

ESCOBAR A, PEREZ M, ROMANELLI G, BLUSTEIN G (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, **13**(12): 9243-9269.

EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing-Version 6.0, 2017.

EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021.

EVEN C, MARLIERE C, GHIGO JM, ALLAIN JM, MARCELLAN A, RASPAUD E (2017). Recent advances in studying single bacteria and biofilm mechanics. *Advances in Colloid and Interface Scienc*e, **247**: 573-588.

EXTREMINA CI, COSTA L, AGUIAR AI, PEIXE L, FONSECA AP. (2011). Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of Microbiological Methods*, **84**(2): 167-173.

FERRIOL-GONZÁLEZ C, DOMINGO-CALAP P (2020). Phages for biofilm removal. *Antibiotics*, **9**(5): 268.

FERRO TA, ARAÚJO JM, dos SANTOS PINTO BL, Dos SANTOS JS, SOUZA EB, Da SILVA, BL, COLARES VLP, NOVAIS TMG, FILHO CMB, STRUVE C, CALIXTO JB, MONTEIRO-NETO V, da SILVA LCN, FERNANDES ES (2016). Cinnamaldehyde inhibits Staphylococcus aureus virulence factors and protects against infection in a Galleria mellonella model. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 2052.

FILKINS LM, GRABER JA, OLSON DG, DOLBEN EL, LYND LR, BHUJU S, O'TOOLE GA (2015). Coculture of Staphylococcus aureus with Pseudomonas aeruginosa drives S. aureus towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model. *Journal of Bacteriology*, **197**(14): 2252-2264.

FLORES-MIRELES A, HREHA TN, HUNSTAD DA (2019). Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, **25**(3): 228-240.

FLORES-MIRELES AL, PINKNER JS, CAPARON MG, HULTGREN SJ (2014). EbpA vaccine antibodies block binding of Enterococcus faecalis to fibrinogen to prevent catheter-associated bladder infection in mice. *Science Translational Medicine*, **6**(254): 254ra127-254ra127. Doi: 10.1126/scitranslmed.3009384

FLORES-MORENO K, MAYORAL-TERAN C, LOPEZ-VIDAL Y (2018). Enterococcus: An Important Opportunistic Pathogen—Basic and Clinical Aspects. In Handbook of Foodborne Diseases. *CRC Press.*

FRED EB (1933). Antony van Leeuwenhoek: On the three-hundredth anniversary of his birth. *Journal of Bacteriology*, **25**(1): iv-2. Doi:10.1128/jb.25.1.iv.2-18.1933

FUTO M, OPAŠIĆ L, KOSKA S, ČORAK N, ŠIROKI T, RAVIKUMAR V, THORSELL A, LENUZZI M, KIFER D, DOMAZET-LOŠO M, VLAHOVIČEK K, MIJAKOVIC I, DOMAZET-LOŠO T (2021). Embryo-like features in developing Bacillus subtilis biofilms. *Molecular Biology and Evolution*, **38**(1):31-47.

GALLUCCI MN, OLIVA M, CASERO C, DAMBOLENA J, LUNA A, ZYGADLO J, DEMO M (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the foodborne microorganisms Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus. *Flavour and Fragrance Journal*, **24**(6): 348-354.

GALVAN EM, MATEYCA C, IELPI L (2016). Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed in vitro by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*, **32**(9): 1067-1077.

GARCIA-GRANJA PE, LÓPEZ J, VILACOSTA I, ORTIZ-BAUTISTA C, SEVILLA T, OLMOS C, SARRIÁ C, FERRERA C, GÓMEZ I, SAN ROMÁN JA (2015). Polymicrobial infective endocarditis: clinical features and prognosis. *Medicine*, **94**(49): e2000. Doi:10.1097/MD.0000000000002000

GASTON JR, ANDERSEN MJ, JOHNSON AO, BAIR KL, SULLIVAN CM, GUTERMAN LB, WHITE AN, BRAUER AL, REARMAN BS, FLORES-MIRELES AL, ARMBRUSTER CE (2020). Enterococcus faecalis polymicrobial interactions facilitate biofilm formation, antibiotic recalcitrance, and persistent colonization of the catheterized urinary tract. *Pathogens*, **9**(10): 835.

GEBREYOHANNES G, NYERERE A, BII C, SBHATU DB (2019). Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*, **5**(8): e02192. Doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02192

GHOSH C, SARKAR P, ISSA R, HALDAR J (2019). Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, **27**(4): 323-338.

GIL-PEROTIN S, RAMIREZ P, MARTI V, SAHUQUILLO JM, GONZALEZ E, CALLEJA I, Menendez R, BONASTRE J (2012). Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Critical Care*, **16**(3): 1-9.

GONZÁLEZ S, FERNÁNDEZ L, CAMPELO AB, GUTIÉRREZ D, MARTINEZ B, RODRIGUEZ A, GARCIA, P. (2017). The behavior of Staphylococcus aureus dual-species biofilms treated with bacteriophage phiIPLA-RODI depends on the accompanying microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**(3): e02821-16. Doi:10.1128/AEM.02821-16

GOPAL R, KIM YG, LEE JH, LEE SK, CHAE JD, SON BK, SEO CH, PARK Y (2014). Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**(3): 1622-1629.

GOWDA J, TAVARAGERI A, KULKARNI R, ANEGUNDI RT, JANARDHAN A, BHAT MA (2021). Comparative assessment of the antimicrobial efficacy of triclosan, amoxicillin and eugenol against Enterococcus faecalis. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, **14**(1): 59-62.

GRANDE R, CARRADORI S, PUCA V, VITALE I, ANGELI A, NOCENTINI A, BONARDI A, GRATTERI P, LANUTI P, BOLOGNA G, SIMEONE P, CAPASSO C, DE LUCA VSUPURAN CT (2021). Selective inhibition of helicobacter pylori carbonic anhydrases by carvacrol and thymol could impair biofilm production and the release of outer membrane vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(21): 11583.

GUNES H, GULEN D, MUTLU R, GUMUS A, TAS T, TOPKAYA AE (2016). Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health*, **32**(2): 246-250.

HAGER CL, ISHAM N, SCHROM KP, CHANDRA J, MCCORMICK T, MIYAGI M, GHANNOUM MA (2019). Effects of a novel probiotic combination on pathogenic bacterial-fungal polymicrobial biofilms. *MBio*, **10**(2): e00338-19. Doi:10.1128/mBio.00338-19

HE Z, ZHANG X, SONG Z, LI L, CHANG H, LI S, ZHOU W (2020). Quercetin inhibits virulence properties of Porphyromas gingivalis in periodontal disease. *Scientific Reports*, **10**(1): 1-13.

HE TF, WANG LH, NIU DB, WEN QH, ZENG XA (2019). Cinnamaldehyde inhibit Escherichia coli associated with membrane disruption and oxidative damage. *Archives of Microbiology*, **201**(4): 451-458.

HENRICI AT (1933). Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology*, **25**(3): 277.

HEUKELEKIAN H, HELLER A (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*, **40**(4): 547.

HIRAI I, OKUNO M, KATSUMA R, ARITA N, TACHIBANA M, YAMAMOTO Y (2010). Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**(6): 1250-1254.

HOFFMAN LR, D'ARGENIO DA, MACCOSS MJ, ZHANG Z, JONES RA, MILLER SI (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, **436**(7054): 1171-1175.

HØIBY N (1974). Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa and the humoral immune response. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, **82**(4): 551-558.

HØIBY N (2014). A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*, **70**(3): 205-211.

HØIBY N, AXELSEN NH (1973). Identification and quantitation of precipitins against Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis by means of crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, **81**(3): 298-308.

HØIBY N, BJARNSHOLT T, MOSER C, BASSI GL, COENYE T, DONELLI G, HALL-STOODLEY L, HOLÁ V, IMBERT C, KIRKETERP-MØLLER K, LEBEAUX D, OLIVER A, ULLMANN AJ, WILLIAMS C (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 21: 1-25.

HOU J, WANG L, ALM M, THOMSEN P, MONSEN T, RAMSTEDT M, BURMØLLE M (2022). Enhanced Antibiotic Tolerance of an In Vitro Multispecies Uropathogen Biofilm Model, Useful for Studies of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Microorganisms*, 10(6):1207.

HUANG Y, WANG Z, CHEN T (2020). Bio-Inspired Surfaces for Fouling Resistance. *The Frontiers of Society, Science and Technology*, **2**(10): 79-98.

HUBERT D, RÉGLIER-POUPET H, SERMET-GAUDELUS I, FERRONI A, LE BOURGEOIS M, BURGEL PR, Serreau R, Dusser D, Poyart C, COSTE J (2013). Association between Staphylococcus aureus alone or combined with Pseudomonas aeruginosa and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, **12**(5): 497-503.

HUNTER, JD (2012). Ventilator associated pneumonia. *Bmj*, **344**:e3325. Doi: 10.1136/bmj.e3325

İGAN H, HANCI H (2022). Distribution of Microorganisms and Antibiotic Resistance of Gram-negative Bacteria Isolated from Urine Cultures of Intensive Care Unit Patients During the Last Four Years. *Türk Yogun Bakim Dergisi*, 20(1): 25-30.

IPE DS, ULETT GC (2016). Evaluation of the in vitro growth of urinary tract infection-causing gram-negative and gram-positive bacteria in a proposed synthetic human urine (SHU) medium. *Journal of Microbiological Methods*, **127**: 164-171.

ISOM CM, FORT B, ANDERSON GG (2022). Evaluating Metabolic Pathways and Biofilm Formation in Stenotrophomonas maltophilia. *Journal of Bacteriology*, **204**(1): e00398-21.

ITISa, Integrated Taxonomic Information System, Erişim Adresi: https://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=9751#null. Erişim Tarihi: 17.01.2021.

ITISb, Integrated Taxonomic Information System, Erişim Adresi: https://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=961474#null. Erişim Tarihi: 17.01.2021.

JAFRI H, BANERJEE G, KHAN MSA, AHMAD I, ABULREESH HH, ALTHUBIANI AS (2020). Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of Candida albicans and Streptococcus mutans. *AMB Express*, **10**(1): 1-9.

JAISWAL S, MISHRA P (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-silver nanoparticles with improved stability and selective toxicity to bacteria over mammalian cells. *Medical Microbiology and Immunology*, **207**(1): 39-53.

JAKHETIA V, PATEL R, KHATRI P, PAHUJA N, GARG S, PANDEY A, SHARMA S (2010). Cinnamon: a pharmacological review. *Journal of Advanced Scientific Research*, **1**(2): 19-23.

JAMAL M, AHMAD W, ANDLEEB S, JALIL F, IMRAN M, NAWAZ MA, HUSSAINA T, ALI M, RAFIQ M KAMİL MA (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, **81**(1): 7-11.

JASIM ST, FARHAN AS (2020). Article Review: Klebsiella Pneumonia: Epidemiology, Virulence Factors and Treatment. *Flora*, **14**(2): 5-10.

JEAN-PIERRE F, VYAS A, HAMPTON TH, HENSON MA, O'TOOLE GA (2021). One versus Many: Polymicrobial Communities and the Cystic Fibrosis Airway. *MBio*, **12**(2): e00006-21. Doi:10.1128/mBio.00006-21

JEYAKUMAR GE, LAWRENCE R (2021). Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against Escherichia coli. *Journal of Herbal Medicine*, **26**:100406. Doi:10.1016/j.hermed.2020.100406

JING S, KONG X, WANG L, WANG H, FENG J, WEI L, MENG Y, LIU C, CHANG X, QU Y, GUAN J, YANG H, ZHANG C, ZHAO Y, SONG W (2022). Quercetin Reduces the Virulence of S. aureus by Targeting ClpP to Protect Mice from MRSA-Induced Lethal Pneumonia. *Microbiology Spectrum*, **10**(2): e02340-21. Doi:10.1128/spectrum.02340-21

JORGE LS, FUCUTA PS, NAKAZONE MA, CHUEİRE AG, COSTA MJ (2018). Outcomes and risk factors for polymicrobial posttraumatic osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Infection*, **3**(1): 20-26.

JUAREZ GE, MATEYCA C, GALVAN EM (2020). Proteus mirabilis outcompetes Klebsiella pneumoniae in artificial urine medium through secretion of ammonia and other volatile compounds. *Heliyon*, **6**(2): e03361. Doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03361

KACHUR K, SUNTRES Z (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **60**(18): 3042-3053.

KALEMBA DAAK, KUNICKA A (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **10**(10): 813-829.

KAPLAN JB, IZANO EA, GOPAL P, KARWACKI MT, KIM S, BOSE JL, KENNETH WB, HORSWILL AR (2012). Low levels of β-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in Staphylococcus aureus. *MBio*, **3**(4): e00198-12. Doi:10.1128/mBio.00198-12

KART D, CIFTCI SY, NEMUTLU E (2020). Altered metabolomic profile of dual-species biofilm: Interactions between Proteus mirabilis and Candida albicans. *Microbiological Research*, **230**: 126346.

KART D, KUSTIMUR AS, SAĞIROĞLU M, KALKANCI A (2017). Evaluation of antimicrobial durability and anti-biofilm effects in urinary catheters against enterococcus faecalis clinical isolates and reference strains. *Balkan Medical Journal*, **34**(6): 546 - 552.

KART D, TAVERNIER S, VAN ACKER H, NELIS HJ, COENYE T (2014). Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by Staphylococcus aureus, Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa. *Biofouling*, **30**(3): 377-383.

KAUR M, VIRDI P, KAUR R, ABIDOV A, LEVINE DL (2021). Polymicrobial Pseudomonas plus Candida Parapsilosis Endocarditis in an Injection Drug User: Considerations for Diagnosis and Management. *Cureus*, **13**(2): e13507. Doi:10.7759/cureus.13507

KAUR S, MODI NH, PANDA D, ROY N (2010). Probing the binding site of curcumin in Escherichia coli and Bacillus subtilis FtsZ–a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(9): 4209-4214.

KHANOLKAR RA, CLARK ST, WANG PW, HWANG DM, YAU YC, WATERS VJ, GUTTMAN DS (2020). Ecological succession of polymicrobial communities in the cystic fibrosis airways. *Msystems*, **5**(6): e00809-20. Doi.org/10.1128/mSystems.00809-20

KIFELEW LG, WARNER MS, MORALES S, THOMAS N, GORDON D.L, MITCHELL J. G, SPECK PG (2020). Efficacy of lytic phage cocktails on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in mixed-species planktonic cultures and biofilms. *Viruses*, **12**(5): 559.

KIYMACI ME, ALTANLAR N, GUMUSTAS M, OZKAN SA, AKIN A (2018). Quorum sensing signals and related virulence inhibition of Pseudomonas aeruginosa by a potential probiotic strain's organic acid. *Microbial Pathogenesis*, **121**:190-197.

KOHNO T, KITAGAWA H, TSUBOI R, NISHIMURA Y, IMAZATO S (2021). Establishment of novel in vitro culture system with the ability to reproduce oral biofilm formation on dental materials. *Scientific Reports*, **11**(1): 1-13.

KONG EF, TSUI C, KUCHARÍKOVÁ S, VAN DIJCK P, JABRA-RIZK MA (2017). Modulation of Staphylococcus aureus response to antimicrobials by the Candida albicans quorum sensing molecule farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**(12): e01573-17. Doi:10.1128/AAC.01573-17

KOO H, BOWEN WH (2014). Candida albicans and Streptococcus mutans: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. *Future Microbiology*, **9**(12): 1295-1297.

KOTHA RR, LUTHRIA DL (2019). Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*, **24**(16): 2930.

KRAGH KN, ALHEDE M, KVICH L, BJARNSHOLT T (2019). Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1: 100006.

KRANZ J, SCHMIDT S, WAGENLEHNER F, SCHNEIDEWIND L (2020). Catheter-associated urinary tract infections in adult patients: Preventive strategies and treatment options. *Deutsches Ärzteblatt International*, **117**(6): 83-88.

KRZYŚCIAK W, KOŚCIELNIAK D, PAPIEŻ M, VYHOUSKAYA P, ZAGÓRSKA-ŚWIEŻY K, KOŁODZIEJ I, BYSTROWSKA B, JURCZAK, A. (2017). Effect of a Lactobacillus salivarius probiotic on a double-species Streptococcus mutans and Candida albicans caries biofilm. *Nutrients*, **9**(11): 1242.

KUEHL R, AL-BATAINEH S, GORDON O, LUGINBUEHL R, OTTO M, TEXTOR M, LANDMANN R (2009). Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(10): 4159-4166.

KWAK JH, SEO JM, KIM NH, ARASU MV, KIM S, YOON MK, KIM SJ (2017). Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (Allium cepa L.) varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **24**(6): 1387-1391.

LARSEN T, FIEHN NE (2017). Dental biofilm infections–an update. *Apmis*, **125**(4): 376-384.

LAUFER AS, METLAY JP, GENT JF, FENNIE KP, KONG Y, PETTIGREW MM (2011). Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *MBio* [Electronic Journal], **2**(1): e00245-10. Doi:10.1128/mBio.00245-10

LEWIS K (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **45**: 999–1007.

LI B, LI X, LIN H, ZHOU Y (2018). Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in S. mutans. *BioMed Research International*, 2018: 4508709.

LIAO W, LIU Y, ZHANG W (2020). Virulence evolution, molecular mechanisms and prevalence of ST11 Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in China: A review over ten last years. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **23**:174-180.

LIM NC, LIM DK, RAY M (2013). Polymicrobial versus monomicrobial keratitis: a retrospective comparative study. *Eye and Contact Len*s, **39**(5): 348-354.

LIMOLI DH, YANG J, KHANSAHEB MK, HELFMAN B, PENG L, STECENKO AA, GOLDBERG JB (2016). Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa co-infection is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **35**(6): 947-953.

LIN Y, ZHANG Y, LİU S, YE D, CHEN L, HUANG N, ZENG W, LİAO W, ZHAN Y, ZHOU T, CAO J (2021). Quercetin Rejuvenates Sensitization of Colistin-Resistant Escherichia coli and Klebsiella Pneumoniae Clinical Isolates to Colistin. *Frontiers in Chemistry*, **9**:795150.

LITTLE W, BLACK C, SMITH AC (2021). Clinical Implications of Polymicrobial Synergism Effects on Antimicrobial Susceptibility. *Pathogens*, **10**(2): 144. Doi:10.3390/pathogens10020144

LIU T, KANG J, LIU L (2021). Thymol as a critical component of Thymus vulgaris L. essential oil combats Pseudomonas aeruginosa by intercalating DNA and inactivating biofilm. *LWT*, 136 : 110354.

LOBO CIV, RINALDI TB, CHRISTIANO CMS, DE SALES LEITE L, BARBUGLI PA, KLEIN MI (2019). Dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Candida albicans exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *Journal of Oral Microbiology*, **11**(1): 1581520.

LOMAKINA GY, MODESTOVA YA, UGAROVA NN (2015). Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry* (*Moscow*), **80**(6): 701-713.

LOU Z, LETSIDIDI KS, YU F, PEI Z, WANG H, LETSIDIDI R (2019). Inhibitive effect of eugenol and its nanoemulsion on quorum sensing–mediated virulence factors and biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Food Protection*, **82**(3): 379-389.

LU H, QUE Y, WU X, GUAN T, Guo H (2019). Metabolomics deciphered metabolic reprogramming required for biofilm formation. *Scientific Reports*, **9**(1) : 1-7.

LV Q, ZHANG P, QUAN P, CUI M, LIU T, YIN Y, CHI G (2020). Quercetin, a pneumolysin inhibitor, protects mice against Streptococcus pneumoniae infection. *Microbial Pathogenesis*, **140**: 103934.

MacDONALD AB, MIRANDA JM (1987). Concurrent neocortical borreliosis and Alzheimer's disease. *Human Pathology*, **18**(7): 759-761.

MACK WN, MACK JP, ACKERSON AO (1975). Microbial film development in a trickling filter. *Microbial Ecology*, **2**(3): 215-226.

MAHARJAN G, KHADKA P, SIDDHI SHILPAKAR G, CHAPAGAIN G, DHUNGANA GR (2018). Catheter-associated urinary tract infection and obstinate biofilm producers. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, **2018**: 7624857.

MAHDI LH, ABDUL-HUR GN, AUDA IG (2020). Evidence of anti-K. pneumoniae biofilm activity of novel Entrococcus faecalis enterocin GLHM. *Microbial Pathogenesis*, 147: 104366.

MARCHESE A, BARBIERI R, COPPO E, ORHAN IE, DAGLIA M, NABAVI SF, IZADI M, ABDOLLAHI M, NABAVI SM, AJAMI M (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Critical reviews in microbiology, **43**(6): 668-689.

MASRI MS, BOOTH AN, DeEDS F (1959). The metabolism and acid degradation of quercetin. *Archives of Biochemistry*, **85**: 284-286.

MATIAS C, SERRANO I, VAN-HARTEN S, MOTTOLA C, MENDES JJ, TAVARES L, OLIVEIRA M (2018). Polymicrobial interactions influence the agr copy number in Staphylococcus aureus isolates from diabetic foot ulcers. *Antonie van Leeuwenhoek*, **111**(11): 2225-2232.

McKINNON K M (2018). Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*, **120**(1): 5-1.

MELO LD, PIRES DP, MONTEIRO R, AZEREDO J (2019). Phage therapy of infectious biofilms: challenges and strategies. In Phage Therapy: A Practical Approach. *Springer, Cham*.

MERMELSTEIN NH (2016). Sizing Up Particles. *Food Technology*, **70**(8): 69-72.

MIKLOSSY J (2011). Alzheimer's disease-a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. *Journal of Neuroinflammation*, **8**(1): 1-16.

MILLER AL, BESSHO S, GRANDO K, TÜKEL Ç (2021). Microbiome or infections: Amyloid-Containing biofilms as a trigger for complex human diseases. *Frontiers in Immunology*, **12**: 514.

MIRZAEI B, BABAEI R, VALINEJAD S (2021). Staphylococcal Vaccine Antigens related to biofilm formation. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, **17**(1): 293-303.

MIRZAEI R, MIRZAEI H, ALIKHANI MY, SHOLEH M, ARABESTANI MR, SAIDIJAM M, KARAMPOOR S, AHMADYOUSEFİ Y, MOGHADAM MS, IRAJİAN GZ, HASANVAND H, YOUSEFIMASHOUF R (2020). Bacterial biofilm in colorectal cancer: What is the real mechanism of action?. *Microbial Pathogenesis*, 142: 104052.

MITCHELL G, SÉGUIN DL, ASSELIN AE, DÉZIEL E, CANTIN AM, FROST EH, MICHAUD S, MALOUIN F (2010). Staphylococcus aureus sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiology*, **10**(1): 1-15.

MOLIN S, TOLKER-NIELSEN T (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(3): 255-261.

MOTA ÉC, OLIVEIRA AC (2019). Catheter-associated urinary tract infection: why do not we control this adverse event? *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 53.

MUTLU G, IMIR T, CENGIZ T, USTAÇELEBI S, TUMBAY E, METE O (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara.

NAPARSTEK L, CARMELI Y, NAVON-VENEZIA S, BANIN E (2014). Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**(4), 1027-1034.

NAYAKA HB, LONDONKAR RL, UMESH MK, TUKAPPA A (2014). Antibacterial attributes of apigenin, isolated from Portulaca oleracea L. *International Journal of Bacteriology*, **2014**: 175851

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M26-A [ISBN 1-56238-384-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1999.

NEGI PS, JAYAPRAKASHA GK, JAGAN MOHAN RAO L, SAKARIAH KK (1999). Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(10): 4297-4300.

NEMUTLU E, ZHANG S, XU YZ, TERZIC A, ZHONG L, DZEJA PD, CHA YM (2015). Cardiac resynchronization therapy induces adaptive metabolic transitions in the metabolomic profile of heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, **21**(6): 460-469.

NICKEL JC, RUSESKA I, WRIGHT JB, COSTERTON JW (1985). Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **27**(4): 619-624.

NISAR MF, KHADIM M, RAFIQ M, CHEN J, YANG Y, WAN CC (2021). Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**: 2497354.

NITIEMA LW, SAVADOGO A, SIMPORE J, DIANOU D, TRAORE AS (2012). In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. International *Journal of Microbiological Research*, **3**(3): 183-187.

NOGUCHI H, MOORE JW (1913). A demonstration of Treponema pallidum in the brain in cases of general paralysis. *The Journal of Experimental Medicine* , **17**(2): 232-238.

NOGUEIRA JOE, CAMPOLINA, GA, BATISTA LR, ALVES E, CAETANO ARS, BRANDÃO RM, NELSON DL, CARDOSO MDG (2021). Mechanism of action of various terpenes and phenylpropanoids against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiology Letters*, **368**(9): fnab052. Doi:10.1093/femsle/fnab052

NOSTRO A, ROCCARO AS, BISIGNANO G, MARINO A, CANNATELLI MA, PIZZIMENTI FC, CIONI PL, PROCOPOI P, BLANCO, AR (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, **56**(4): 519-523.

ORAZI G, O'TOOLE GA (2019). "It takes a village": mechanisms underlying antimicrobial recalcitrance of polymicrobial biofilms. *Journal of Bacteriology*], **202**(1): e00530-19. Doi:10.1128/JB.00530-19

OUYANG J, SUN F, FENG W, SUN Y, QIU X, XIONG L, LIU Y, CHEN Y (2016). Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in Pseudomonas aeruginosa. Journal of Applied Microbiology, **120**(4): 966-974.

PACZOSA MK, MECSAS J (2016). Klebsiella pneumoniae: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **80**(3): 629-661.

PAMMI M, ZHONG D, JOHNSON Y, REVELL P, VERSALOVIC J (2014). Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, **14**(1): 1-8.

PATEL R (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **437**:41–47.

PATEL RV, MISTRY BM, SHINDE SK, SYED R, SINGH V, SHIN HS (2018). Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **155**: 889-904.

PELLING H, NZAKIZWANAYO J, MILO S, DENHAM EL, MACFARLANE WM, BOCK LJ, SUTTON JM JONES BV (2019). Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Letters in Applied Microbiology*, **68**(4): 277-293.

PENESYAN A, PAULSEN IT, KJELLEBERG S ET AL (2021). Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *npj Biofilms Microbiomes* **7**: 80.

PERCIVAL SL, MALONE M, MAYER D, SALISBURY AM, SCHULTZ G (2018). Role of anaerobes in polymicrobial communities and biofilms complicating diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*, **15**(5): 776-782.

PERCIVAL SL, SULEMAN L, VUOTTO C, DONELLI G (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology*, **64**(4): 323-334.

PEREIRA WA, PEREIRA CDS, ASSUNÇÃO RG, da SILVA ISC, REGO FS, ALVES LS, SANTOS JS, NOGUEIRA FJR, ZAGMIGNAN A, THOMSEN T, LOBNER-OLESEN A, KROGFELT KA, da

SILVA LCN, ABREU AG (2021). New insights into the antimicrobial action of Cinnamaldehyde towards Escherichia coli and its effects on intestinal colonization of mice. *Biomolecules*, **11**(2): 302.

PERUMAL SAMY R, GOPALAKRISHNAKONE P (2010). Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **7**(3): 283-294.

PINTO AM, CERQUEIRA MA, BAÑOBRE-LÓPES M, PASTRANA LM, SILLANKORVA S (2020). Bacteriophages for chronic wound treatment: From traditional to novel delivery systems. *Viruses*, **12**(2): 235.

PINTO H, SIMÕES M, BORGES A (2021). Prevalence and impact of biofilms on bloodstream and urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis. *Antibiotics*, **10**(7): 825.

PROCOP G, CHURCH D, HALL G, JANDA WM, KONEMAN E, SCHRECKENBERGER PC, WOODS GL (2017). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Color-Türkçe Baskı, Editörler: BASUSTAOGLU A, Us D, Hipokrat Yayınevi.

RADLINSKI L, ROWE SE, KARTCHNER LB, MAILE R, CAIRNS BA, VITKO NP, CONLON BP (2017). Pseudomonas aeruginosa exoproducts determine antibiotic efficacy against Staphylococcus aureus. *PLoS Biology*, **15**(11): e2003981. Doi:10.1371/journal.pbio.2003981

RAHMANI AH, ALSAHLI MA, ALY SM, KHAN MA, ALDEBASI, YH (2018). Role of curcumin in disease prevention and treatment. Advanced biomedical research, **7**:38. Doi: 10.4103/abr.abr_147_16

RINALDO S, GIARDINA G, MANTONI F, PAONE A, CUTRUZZOLÀ F (2018). Beyond nitrogen metabolism: nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, **365**(6):fny029. Doi:10.1093/femsle/fny029

ROBERTS CG (2013). The role of biofilms in reprocessing medical devices. *American Journal Of Infection Control*, **41**(5): 77-80.

RÖMLING U, BALSALOBRE C (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. Journal of internal medicine, **272**(6), 541-561.

RYALL B, EYDALLIN G, FERENCI T (2012). Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**(3): 597-625.

SAAD NA, ZAABA SK, ZAKARIA A, KAMARUDIN LM, WAN K, SHARIMAN AB (2014). Quartz crystal microbalance for bacteria application review. *2nd International Conference on Electronic Design (ICED)*, 455-460.

SALEHI B, STOJANOVIĆ-RADIĆ Z, MATEJIĆ J, SHARIFI-RAD M, KUMAR NVA, MARTINS N, SHARIFI-RAD, J (2019). The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. European Journal of Medicinal Chemistry, **163**: 527-545.

SAQUIB SA, ALQAHTANI NA, AHMAD I, KADER MA, AL SHAHRANI SS, ASIRI EA (2019). Evaluation and comparison of antibacterial efficacy of herbal extracts in combination with antibiotics on periodontal pathobionts: An in vitro microbiological study. Antibiotics, **8**(3): 89.

SARTINI S, PERMANA AD, MITRA S, TAREQ AM, SALIM E, AHMAD I, NAINU F (2021). Current State and Promising Opportunities on Pharmaceutical Approaches in the Treatment of Polymicrobial Diseases. *Pathogens*, **10**(2): 245.

SATO Y, UNNO Y, UBAGAI T, ONO Y (2018). Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote Acinetobacter baumannii biofilm formation. *PLoS One* , **13**(3): e0194556. Doi:10.1371/journal.pone.0194556

SAWICKI R, GOLUS J, PRZEKORA A, LUDWICZUK A, SIENIAWSKA E, GINALSKA G (2018). Antimycobacterial activity of cinnamaldehyde in a Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) model. Molecules, **23**(9): 2381.

SCHEUERL T, HOPKINS M, NOWELL RW, RIVETT DW, BARRACLOUGH TG, BELL T (2020). Bacterial adaptation is constrained in complex communities. *Nature Communications*, **11**(1): 1-8.

SENEVIRATNE CJ, SRIVASTAVA N, ISLAM I, FOONG K, ALLEN F (2017). Microbial Biofilms: An Introduction to Their Development, Properties and Clinical Implications. In Microbial Biofilms (pp. 1-32). CRC Press.

SHARMA D, RANI R, CHATURVEDI M, ROHILLA P, YADAV JP (2019). In silico and in vitro approach of Allium cepa and isolated quercetin against MDR bacterial strains and Mycobacterium smegmatis. *South African Journal of Botany*, **124**: 29-35.

SHARMA UK, SHARMA AK, PANDEY, AK (2016). Medicinal attributes of major phenylpropanoids present in cinnamon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**(1): 1-11.

SHE P, WANG Y, LIU Y, TAN F, CHEN L, LUO Z, WU Y (2019). Effects of exogenous glucose on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and antibiotic resistance. *Microbiologyopen*, **8**(12),:e933. Doi:10.1002/mbo3.933

SHEN S, ZHANG T, YUAN Y, LIN S, XU J, YE H (2015). Effects of cinnamaldehyde on Escherichia coli and Staphylococcus aureus membrane. *Food Control*, **47**: 196-202.

SINGH AK, YADAV S, CHAUHAN BS, NANDY N, SINGH R, NEOGI K, ROY JK, SRIKRISHNA S, SINGH RK, PRAKASH P (2019). Classification of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Frontiers in Microbiology* , **10**:669.

SOUSA SILVEIRA ZD, MACEDO NS, SAMPAIO DOS SANTOS JF, SAMPAIO DE FREITAS T, RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA C, JUNIOR DLDS, MUNIZ DF, OLIVEIRA LCC, JUNIOR JPS, CUNHA FAB, COUTINHO HDM, BALBINO VQ MARTINS, N. (2020). Evaluation of the antibacterial activity and efflux pump reversal of thymol and carvacrol against Staphylococcus aureus and their toxicity in Drosophila melanogaster. *Molecules*, **25**(9): 2103.

SRITHARADOL R, HAMADA M, KIMURA S, ISHII Y, SRICHANA T, TATEDA K (2018). Mupirocin at subinhibitory concentrations induces biofilm formation in Staphylococcus aureus. *Microbial Drug Resistance*, **24**(9): 1249-1258.

STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, HOLA V, BONAVENTURA GD, DJUKIĆ S, ĆIRKOVIĆ I, RUZICKA F (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, **115**(8): 891-899.

STOCKERT JC, HOROBIN RW, COLOMBO LL, BLÁZQUEZ-CASTRO A (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, **120**(3): 159-167.

SUBBIAHDOSS G, REIMHULT E (2020). Biofilm formation at oil-water interfaces is not a simple function of bacterial hydrophobicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **194**:111163.

SUBRAMANIAN S, HUISZOON RC, CHU S, BENTLEY WE, GHODSSI R (2020). Microsystems for biofilm characterization and sensing–A review. *Biofilm,*, **2**: 100015.

TAGOUSOP CN, TAMOKOU JDD, KENGNE IC, NGNOKAM D, VOUTQUENNE-NAZABADIOKO L (2018). Antimicrobial activities of saponins from Melanthera elliptica and their synergistic effects with antibiotics against pathogenic phenotypes. *Chemistry Central Journal*, **12**(1): 1-9.

TAHERI Y, SULERIA HAR, MARTINS N, SYTAR O, BEYATLI A, YESKALIYEVA B, SEITIMOVA G, SALEHI B, SEMWAL P, PAINULI S, KUMAR A, AZZINI E, MARTORELL M, SETZER WN, MAROYI A SHARIFI-RAD J (2020). Myricetin bioactive effects: Moving from preclinical evidence to potential clinical applications. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **20**(1): 1-14.

TAKAHASHI H, NAKAMURA A, FUJINO N, SAWAGUCHI Y, SATO M, KUDA T, KIMURA B (2021). Evaluation of the antibacterial activity of allyl isothiocyanate, clove oil, eugenol and carvacrol against spoilage lactic acid bacteria. *LWT* , **145**: 111263.

TAN L, LI SR, JIANG B, HU XM, LI S (2018). Therapeutic targeting of the Staphylococcus aureus accessory gene regulator (agr) system. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 55.

TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, SHANKAR N (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **60**(12): 2622-2636.

TENKE P, KOVACS B, JOHANSEN TEB, MATSUMOTO T, TAMBYAH PA, NABER KG (2008). European and Asian guidelines on management and prevention of catheter-associated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **31**: 68-78.

TEOW SY, ALI SA (2015). Synergistic antibacterial activity of Curcumin with antibiotics against Staphylococcus aureus. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **28**(6): 2109-2114.

THEILACKER C, SANCHEZ-CARBALLO P, TOMA I, FABRETTI F, SAVA I, KROPEC A, HUEBNER J (2009). Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in Enterococcus faecalis. *Molecular Microbiology*, **71**(4): 1055-1069.

THOMPSON LR, SANDERS JG, MCDONALD D, AMIR A, LADAU J, LOCEY KJ, NAVAS-MOLINA JA (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, **551**(7681): 457-463.

TOMAR AP, KUSHWAH A, SHAH H (2017). Identification and susceptibility pattern of Gram negative bacterial isolates of Catheter Associated Urinary Tract Infections (CAUTI) in a tertiary care institute. *Indian Journal of microbiol*ogy, **4**: 373-376.

TOMKOVICH S, JOBIN C (2018). Microbial networking in cancer: when two toxins collide. *British Journal of Cancer*, **118**(11): 1407-1409

TOPA SH, PALOMBO EA, KINGSHOTT P, BLACKALL LL (2020). Activity of cinnamaldehyde on quorum sensing and biofilm susceptibility to antibiotics in Pseudomonas aeruginosa. *Microorganisms*, **8**(3): 455.

TUKEL Ç, WILSON RP, NISHIMORI JH, PEZESHK M, CHROMY BA, BÄUMLER AJ (2009). Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell Host and Microbe*, **6**(1): 45-53.

TYAGI P, SINGH M, KUMARI H, KUMARI A, MUKHOPADHYAY K (2015). Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PloS One*, **10**(3): e0121313. Doi:10.1371/journal.pone.0121313

TYTGAT HL, NOBREGA FL, VAN DER OOST J, DE VOS WM (2019). Bowel biofilms: tipping points between a healthy and compromised gut?. *Trends in Microbiology*, **27**(1): 17-25.

ULANOWSKA M, OLAS B (2021). Biological Properties and prospects for the application of eugenol—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(7): 3671.

UTCHARIYAKIAT I, SURASSMO S, JATURANPINYO M, KHUNTAYAPORN P, CHOMNAWANG MT (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**(1): 1-7.

VÁZQUEZ C, LAGO N, LEGIDO JL, ARIAS I, CASÁS LM, MATO MM (2013). Microcalorimetric study of the growth of Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae and their mixtures in an enriched culture medium. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **113**(3): 1415-1420.

VESTERGAARD M INGMER H (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. International Journal of Antimicrobial Agents, **53**(6), 716-723.

VIGASOVA D, NEMERGUT M, LISKOVA B, DAMBORSKY J (2021). Multi-pathogen infections and Alzheimer's disease. *Microbial Cell Factories*, **20**(1): 1-13.

WANG G, ZHAO G, CHAO X, XIE L, WANG H (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17**(17): 6278.

WANG X, TIAN L, FU J, LIAO S, YANG S, JIA X, GONG G (2022). Evaluation of the membrane damage mechanism of thymol against Bacillus cereus and its application in the preservation of skim milk. *Food Control*, **131**: 108435.

WANG YM, KONG LC, LIU J, MA HX (2018). Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant Escherichia coli strains. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **7**(1): 1-9.

WEISER J, HENKE HA, HECTOR N, BOTH A, CHRISTNER M, BÜTTNER H, & ROHDE H (2016). Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent Staphylococcus epidermidis biofilm formation and immune evasion. *International Journal of Medical Microbiology*, **306**(6): 471-478.

WILSON C, LUKOWICZ R, MERCHANT S, VALQUIER-FLYNN H, CABALLERO J, SANDOVAL J, HOLMES AE (2017). Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. *Research and Reviews Journal of Engineering and Technology*, **6**(4).

WYRES KL, LAM M, HOLT KE (2020). Population genomics of Klebsiella pneumoniae. *Nature Reviews Microbiology*, **18**(6): 344-359.

XU J, ZHOU F, JI BP, PEI RS, XU N (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli. *Letters in Applied Microbiology*, **47**: 174–179.

YADAV MK, YADAV P, DHIMAN M, TEWARI S, TIWARI SK (2022). Plantaricin LD1 purified from Lactobacillus plantarum LD1 inhibits biofilm formation of Enterococcus faecalis ATCC 29212 in tooth model. *Letters in Applied Microbiology*. Doi:10.1111/lam.13668

YANG D, WANG T, LONG M, LI P(2020). Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2020**: 8825387.

YANG JY, LEE HS (2012). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of morin isolated from mulberry fruits (Morus alba L.). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **55**(4), 485-489.

YU W, HALLINEN KM, WOOD KB (2018). Interplay between antibiotic efficacy and drug-induced lysis underlies enhanced biofilm formation at subinhibitory drug concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**(1): e01603-17. Doi:10.1128/AAC.01603-17

ZACCHINO SA, BUTASSI E, DI LIBERTO M, RAIMONDI M, POSTIGO A, SORTINO M (2017). Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine*, **37**:27-48.

ZHANG X, ZHOU D, CAO Y, ZHANG Y, XİAO X, LİU F, YU Y (2022). Synergistic inactivation of Escherichia coli O157: H7 and Staphylococcus aureus by gallic acid and thymol and its potential application on fresh-cut tomatoes. *Food Microbiology*, 102: 103925.

ZHENG JX, BAI B, LIN ZW, PU ZY, YAO WM, CHEN Z, LI DY, DENG XB, DENG QW, YU ZJ (2018). Characterization of biofilm formation by Enterococcus faecalis isolates derived from urinary tract infections in China. *Journal of Medical Microbiology*, **67**(1): 60.

ZHU Z, WANG Z, LI S, YUAN X (2019). Antimicrobial strategies for urinary catheters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **107**(2): 445-467.

ZOBELL CE (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, **46**(1):39.

ZOBELL CE, ALLEN EC (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, **29**(3): 239.

ZOBELL CE, ANDERSON DQ (1936). Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *The Biological Bulletin*, **71**(2): 324-342.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Raporu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilm oluşumu üzerine antimikrobiyal ajanların sinerjik etkilerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:18-1124-17**	**Tarih:13 Kasım 2017**	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Levent YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒	
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒	
Doç.Dr.Derya GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Ali Doğan DURSUN	Fizyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒	
Yrd.Doç.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
İffet BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilm oluşumu üzerine antimikrobiyal ajanların sinerjik etkilerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Nurten ALTANLAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Metodolojik Çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.