TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PATOJEN MİKROORGANİZMALARDA BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİMİNİN, BAZI BİYOSÜRFEKTAN MADDELER İLE PROPOLİSİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA NUR TÜRKOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ERKAN RAYAMAN
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PATOJEN MİKROORGANİZMALARDA BİYOSÜRFEKTAN ÜRETİMİNİN, BAZI BİYOSÜRFEKTAN MADDELER İLE PROPOLİSİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA NUR TÜRKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ERKAN RAYAMAN
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Büşra Nur Türkoğlu

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca sabırla bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, bu süreci birlikte tamamladığım ve kendisinden çok şey öğrendiğim sevgili danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Erkan Rayaman‘ a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bize desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Turgut Taşkın hocama, mikroorganizmaların teminini sağlayan Prof. Dr. Rıza Adaleti hocama teşekkür ederim.

Sürecin en başından beri benimle birlikte heyecanlanan ve yeni bilgiler öğrenmekten zevk duyan babam Musa Kurukavak başta olmak üzere beni bu günlere getiren ve her daim arkamda duran değerli aileme, sabır ve emekleri için,

Kıymetli eşim Mansur Türkoğlu’ na tüm fedakarlığı ve desteği, hayatın her noktasında olduğu gibi bu yolda da beni bir an olsun yalnız bırakmadığı için çokça teşekkür ediyorum.

Çalışmada kullandığımız ham propolis örneklerinin tedariğinde bize destek veren İstanbul Bal Evi’nin kurucusu Mustafa Toktaş’a

Yüksek lisans çalışmaları boyunca bir arada paylaşım içinde olduğumuz arkadaşlarım Yıldız Aslan, Elif Karpuz, Sena Aral, Sinem Sezen, Elif Yedikardeş ve Elif Kaya ‘ya

Bu çalışmayı SAG-C-YLP-080519-0176 numaralı proje ile destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ i
TABLO LİSTESİ ii
ŞEKİL LİSTESİ iii
1. ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER 6
4.1. Biyosürfektanlar 6
4.2. Propolis 8
4.3. Biyofilm 9
4.4. Çalışmada Yer Alan Patojen Mikroorganizmalar 10
4.4.1. *Pseudomonas aeruginosa* 10
4.4.2. *Acinetobacter baumannii* 11
4.4.3 *Escherichia coli* 12
4.4.4 *Staphylococcus aureus* 13
4.4.5 *Enterococcus faecalis* 14
5. GEREÇ ve YÖNTEM 16
5.1. Gereçler 16
5.1.1. Mikroorganizmalar 16
5.1.2. Propolisler 17
5.1.3. Biyosürfektanlar 18
5.1.4. Besiyeri ve katkıları 18
5.2.1. Propolis ekstraktlarının hazırlanması 19
5.2.2. Biyosürfektan oluşumunun tespiti 19
5.2.3. Biyofilm oluşumunun tespiti 20
5.2.4. Örneklerin hazırlanması 21
5.2.5. Propolis ve biyosürfektanların oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinliğin tespiti 21
5.2.6. Propolis ve biyosürfektanların minimum inhibitör konsantrasyon ve minumum bakterisidal konsantrasyonun tespiti 22
5.2.7. Propolis ve biyosürfektanların biyofilm oluşumu üzerine olan etkinliğin tespiti 22
5.2.8. Propolis ve biyosürfektanların minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonunun (MBEK) tespiti 24
6. BULGULAR 25

6.1. Biyosürfektan Oluşumunun Tespiti 25
6.2. Klinik İzolatların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi 25
6.3. Propolis ve Biyosürfektanların Oluk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinliğin Tespiti 26
6.4. Propolis ve Biyosürfektanların Minimum İnhibitor ve Minumum Bakterisidal Konsantrasyonlarının Tespiti 27
6.5. Propolis ve Biyosürfektanların Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkinlikleri 30
6.6. Propolis ve Biyosürfektanların Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun Tespiti 39
7. TARTIŞMA ve SONUÇ 42
8. KAYNAKLAR 53
10. BİLİMSEL FAALİYETLER 63

KISALTMALAR LİSTESİ

Ab10 : *A. baumannii* 10 numaralı klinik suş

DMSO : Dimetil sülfoksit

Ec 20 : *E. coli* 20 numaralı klinik suş

Ef20 : *E. faecalis* 20 numaralı klinik suş

KMHB : Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth

MBEK : Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu

MBK : Minimum Bakterisidal Konsantrasyon

MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MR20 : Metisiline Dirençli *S. aureus* 20 numaralı klinik suş

MRSA : Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

MS20 : Metisiline Duyarlı *S. aureus* 20 numaralı klinik suş

MSSA : Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*

Pa10 : *P. aeruginosa* 10 numaralı klinik suş

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan klinik suşlar ve izole edildiği klinik örnekler	16
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan propolis örnekleri ve toplandığı bölgeler	18
Tablo 3.	Klinik izolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri	25
Tablo 4.	Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların antimikrobiyal etkinliği	26
Tablo 5.	Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen standart ve klinik izolatlara karşı MİK ve MBK değerleri	29
Tablo 6.	*P. aeruginosa* ATCC 27853'ün biyofilm oluşumu üzerine propolis örneklerinin ve biyosürfektanların etkinliği	30
Tablo 7.	*P. aeruginosa* PAO1'in biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	31
Tablo 8.	*A. baumannii* ATCC 19606'nın biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	32
Tablo 9.	*A. baumannii* Ab 10'un biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	33
Tablo 10.	*S. aureus* ATCC 43300'un biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	34
Tablo 11.	*S. aureus* MR 20'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	35
Tablo 12.	*S. aureus* ATCC 29213'ün biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	36
Tablo 13.	*S. aureus* MS 20'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	37
Tablo 14.	*E. faecalis* ATCC 29212'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	38
Tablo 15.	*E. faecalis* Ef 20'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği	39
Tablo 16.	Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen standart suş ve klinik izolatlara karşı MBEK değerleri	40

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1.	Biyofilm gelişiminin aşamaları	10
Şekil 2.	*P. aeruginosa* ATCC 27853 SEM mikrografisi	11
Şekil 3.	*A. baumanni* SEM mikrografı	12
Şekil 4.	*E. coli* ATCC 25922 FESEM mikrografı	13
Şekil 5.	*S. aureus* ATCC 29213 SEM mikrografı	14
Şekil 6.	*E. faecalis* SEM mikrografı	15
Şekil 7.	Biyofilm oluşumunun inhibisyonunun tespitinde kullanılan deney şablonu	23
Şekil 8.	*S. aureus* MS20 klinik izolatı üzerine propolis örneklerinin ve ramnolipid ile soforolaktonun antimikrobiyal etkinliği	27
Şekil 9.	MBEK değerinin tespit edilmesinde kullanılan ve *P. aeruginosa* PAO1'ya ait ekim sonuçlarına ait kültür görseli	41

1. ÖZET

Tezin başlığı: Patojen Mikroorganizmalarda Biyosürfektan Üretiminin, Bazı Biyosürfektan Maddeler ile Propolisin Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı: Büşra Nur Türkoğlu
Danışmanın Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Erkan Rayaman
Programın Adı: Farmasötik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

Amaç: Çalışmamızda, patojen mikroorganizmalarda biyosürfektan madde üretiminin araştırılması, ayrıca biyosürfektan maddelerin ve çeşitli yörelerden elde edilen propolisin; antibakteriyal ve antibiyofilm aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda örnek olarak Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış olan 10 propolis örneği, biyosürfektan olarak ramnolipid ve soforolakton kullanılmıştır. Mikroorganizma olarak 7 standart bakteri ve 127 adet klinik izolat kullanılmıştır. Biyosürfektan üretimi damla çökmesi (drop-collaps) yöntemi ile patojenlerin biyofilm oluşturma yetenekleri tespiti kristal viyole kullanılarak mikroplaka yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin tespiti oluk difüzyon yöntemi ile MİK ve MBK tespiti mikrodilüsyon yöntemi ile MBEK tespiti ise glikozlu TSB kullanılarak mikroplak yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmada kullanılan her bakteri türünde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların özellikle Gram pozitif bakterilere karşı daha güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip oldukları görülmektedir. Propolis örnekleri için MİK değerleri 0,16->166,66 mg/mL, MBK değerleri ise 0,32->166,66 mg/mL aralığında, ramnolipid için, MİK değerleri 5,2-20,83 mg/mL, MBK değerleri ise 10,4->166,66 mg/mL aralığında, soforolakton için MİK değerleri 1,04-4,16 mg/mL, MBK değerleri ise 2,08->33,33 mg/mL aralığında değişmektedir. Biyofilm gelişiminin inhibisyonunun propolis örnekleri için %0-100, ramnolipid için %0-90, soforolipid için ise %0-92 aralığında olduğu, biyofilm inhibisyon etkinliğinin Gram pozitif bakterilerde ve özellikle biyosürfektanlarda daha güçlü olduğu, tespit edilen MBEK değerlerinin oldukça yüksek konsantrasyonlar olduğu ve çalışılan konsantrasyonların üzerindeki konsantrasyonların gerektiği görülmektedir.

Sonuç: Propolis örnekleri, ramnolipid ve soforolaktonun gerek antimikrobiyal aktivite gerekse antibiyofilm aktivite açısından oldukça etkin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biyosürfekran, ramnolipid, soforolakton, antibiyofilm, patojen mikroorganizmalar

2. SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of Biosurfactant Production in Pathogenic Microorganisms and the Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Some Biosurfactant Compounds and Propolis

Student Name, Surname: Büşra Nur Türkoğlu
Supervisor Name: Assistant Professor Dr. Erkan Rayaman
Program Name: Pharmaceutical Microbiology

Objective: In our study, the aim was to investigate the biosurfactant production in pathogenic microorganisms, as well as to examine the antibacterial and antibiofilm activities of biosurfactant compounds and propolis obtained from various regions

Materials and Methods: In our study, 10 propolis samples collected from different regions of Turkey were used as examples, while rhamnolipid and sophorolipid were employed as biosurfactants. Seven standard bacterial strains and 127 clinical isolates were used as microorganisms. Biosurfactant production was determined using the drop-collapse method, the ability of pathogens to form biofilms was assessed using crystal violet in a microplate assay, antimicrobial activity was evaluated by the agar well diffusion method, MIC and MBC were determined using the microdilution method, and MBEC determination was performed using glucose-enriched TSB in the microplate method.

Results: Biofilm formation was detected in each bacterial species used in the study. It was observed that propolis samples and biosurfactants exhibited stronger antimicrobial activity, especially against Gram-positive bacteria. The MIC values for propolis samples ranged from 0,16 to >166,66 mg/mL, and the MBC values ranged from 0,32 to >166,66 mg/mL. For rhamnolipids, the MIC values ranged from 5,2 to 20,83 mg/mL, and the MBC values ranged from 10,4 to >166,66 mg/mL. For sophorolactone, the MIC values ranged from 1,04 to 4,16 mg/mL, and the MBC values ranged from 2,08 to >33,33 mg/mL. The inhibition of biofilm development was found to range from 0% to 100% for propolis samples, 0% to 90% for rhamnolipids, and 0% to 92% for sophorolactone. It was determined that biofilm inhibition efficacy was stronger in Gram-positive bacteria, particularly with biosurfactants, and that the MBEK values detected were at considerably high concentrations, indicating the need for concentrations above those tested in this study.

Conclusion: It has been observed that propolis samples, rhamnolipids, and sophorolipids are quite effective in terms of both antimicrobial activity and antibiofilm activity.

Keywords: Biosurfactant, rhamnolipid, sophorolactone, antibiofilm, pathogenic microorganisms

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Enfeksiyon hastalıkları insan sağlığını etkileyen en önemli hastalıklardan biridir. Günümüzde antimikrobiyal direnç nedeni ile mevcut antimikrobiyal ilaçlar ile tedavi edilemeyecek olan enfeksiyon etkenleri dünya çapında yayılmaktadır. Bu yayılış karşısında maaliyet yüksekliği ve ilaçların direnç nedeni ile hızlı şekilde etkisiz hale gelmesi, ilaç sanayii firmalarının bu konuda yeterli düzeyde çalışmamasına neden olmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal özellikte yeni bileşiklerin bulunması insan sağlığı açısından önem arz etmektedir (WHO, 2024; Laxminarayan ve ark., 2024).

Mikroorganizmaların enfeksiyon geliştirme süreçlerinde virulans faktörü adı verilen bazı özellikleri ile sağlamaktadır. Biyofilm bu virulans faktörlerinin başında gelmektedir. Biyofilm, mikroorganizmaların, özellikle bakterilerin, bir yüzeye yapışarak oluşturdukları, kendilerini koruyan ve birbirleriyle etkileşen polisakkarit, protein ve diğer makromoleküllerden oluşan yapışkan özellikteki yapıları tanımlamaktadır. Biyofilmler, canlı ve cansız yüzeylerde oluşabilmektedir. Bakteriler bu yapıları, çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlamak, besin kaynaklarını toplamak ve birbirleriyle iletişim kurmak için oluştururlar. Biyofilm oluşumu gerçekleştiğinde tedavi için kullanılan antimikrobiyal ilaçlar mikroorganizmalara yeterli düzeyde ulaşamamakta, bu durumda direnç gelişimine ve kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca biyofilmler enfeksiyon odağı olarak da rol alabilmektedir. Bu nedenle mikroorganizmaların biyofilm gelişimini yok eden/azaltan bileşiklerin bulunması enfeksiyon hastalıklarının gelişimini engelleyebilecek ya da şiddetini azaltabilecektir (Leitao, 2020; Rabin ve ark., 2015, Nadar ve ark., 2022; Rather ve ark., 2021).

Bu amaçlar ile çalışmamızda biyosürfektanlar ve propolis'in antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliği araştırılmıştır.

Sürfektanlar, hem biyolojik hem de kimyasal kökenli hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşan amfipatik moleküllerdir. Farklı fazlardaki yüzeyler arasında arayüzey aktivitesi gösterir, arayüz davranışını değiştirir ve diğer moleküllerin arayüzlerde ve çözeltilerde nasıl davrandığını etkilerler. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) biyosürfektanları ilaç kullanımı için onaylamıştır. Sürfektanların gıda, ilaç, kozmetik, petrol endüstrileri ve atık su arıtma gibi geniş kullanım alanları mevcuttur. Son yıllarda, kimyasal yüzey aktif maddelerinin çevresel

etkilerine vurgu yapıldığından araştırmacılar, farmasötik ve biyomedikal alanda kullanılmak üzere yeni yüzey aktif madde arayışına yönelmişlerdir (Van Hamme ve ark., 2006; Shikha ve ark., 2020).

Biyosürfektanlar, bazı bakteri, maya ve küf türleri tarafından sentezlenip hücre dışına salınan yüzey aktif moleküllerdir. Biyosürfektanlar; glikolipidler, lipopeptitler ve lipoproteinler, fosfolipidler ve yağ asitleri ile polimerik ve partiküler biyosürfektanlar şeklinde 5 sınıfta ele alınır. Biyosürfektanlar ilaç ve kozmetik sanayii, gıda ve diğer endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Sentetik sürfektanlara göre avantajları yüksektir. Biyosürfektanlar, aşırı pH, tuzluluk ve sıcaklık gibi koşullarda stabil kalabilmeleri gibi ilginç fizikokimyasak özelliklere sahiptirler. Sentetik sürfektanlara kıyasla eşdeğer veya düşük toksisiteye sahip olmaları, biyolojik atık oluşturmamaları ve doğada hızlı olarak yıkılabilmeleri ile öne çıkmaktadırlar (Kosaric, 2001; Kaya ve ark., 2007; Sen, 2010; Mnif ve ark., 2016).

Yapılan araştırmalar sonucunda biyosürfektanların antibakteriyel, antifungal, antitümör, antiviral ve insektisidal özellik gösterdikleri bildirilmiştir. Bu nedenle yeni biyosürfektan üretimi yapabilecek mikroorganizmaların tespiti ve mevcut biyosürfektanların yeni etkinliklerinin belirlenmesi önemlidir (Sen, 2010). Bunun yanında patojen mikroorganizmalar tarafından biyosürfektan üretiminin yapılıp yapılmadığı konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda klinik *Pesudomonas aeruginosa* izolatlarında biyosürfektan üretiminin varlığı araştırılmıştır.

Propolis, bal arılarının bitkilerden topladıkarı ve bir miktar bal mumu ekleyip enzimleriyle biyokimyasal değişiliğe uğratarak oluşturdukları reçinemsi maddedir. İçeriği toplandığı zamana ve bitki çeşitliliğine göre değişiklik gösterir. Propolis en bilinen özelliği kovan içerisinde mikrobiyolojik korumayı sağlamaktadır. Bununla beraber kovandaki hasarların giderilmesinde kullanıldığı, istenilen sıcaklık ve nem koşullarını sağlanmasında rol aldığı da bilinmektedir (Polat ve ark., 2023; Bayatbalay, 2021). Kimyasal bileşimlerine göre karakterize edilen ve sınıflandırılan farklı propolis türleri bulunmaktadır. Propolisin içeriğinde fenolik bileşikler, flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik asit esterleri gibi 300'den fazla bileşen bulunmuştur (Pimenta ve ark., 2015). Literatürde propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser, antitümör, lokal anestezik, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri ile kalp ve diyabet gibi kronik hastalıklar, kanser, ağız ve diş hastalıkları, viral hastalıklar, gastrointestinal, nörolojik

ve deri hastalıklarında olumlu yönde etkisinin bulunduğu çalışmalara rastlanmaktadır. Propolis, tıp, eczacılık, veterinerlik, gıda, tarım ve mobilyacılık sektörlerinde, apiterapi merkezlerinde, dermatolojik ve kozmetik uygulamalarda çok yönlü olarak kullanılmakta ve yeni özellikleri keşfedildikçe de kullanım alanları artmaktadır (Kösedağ, 2021; Uğur, 2021; Çekin, 2023).

Bu bilgilerin ışığında bu tez çalışmasında klinik *Pseudomonas aeruginosa* şularında, biyosürfektan üretiminin tespit edilmesi, biyosürfektan olarak ramnolipid ve soforolaktonun ve ülkemizin farklı bölgelerinden toplanmış 10 çeşit propolisin, insanda en sık karşılaşılan enfeksiyon etkenlerinden olan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* mikroorganizmalarının standart ve klinik suşları üzerine antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Biyosürfektanlar

Sürfektanlar, hem biyolojik hem de kimyasal kökenli hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşan amfipatik moleküllerdir. Bu moleküller arayüzlerde birikir, arayüz gerilimlerini azaltır ve miseller gibi agregat yapılar oluştururlar. Farklı fazlardaki yüzeyler arasında arayüzey aktivitesi gösterir, arayüz davranışını değiştirir ve diğer moleküllerin arayüzlerde ve çözeltilerde nasıl davrandığını etkilerler. Yüzey aktif maddeler genellikle kritik misel konsantrasyonu (CMC), hidrofobik-hidrofilik denge (HLB), kimyasal yapı ve yük gibi özelliklerle tanımlanır ve kaynağına göre sınıflandırılır. FDA, biyosürfektanları ilaç kullanımı için onaylamıştır. Sürfektanların gıda, ilaç, kozmetik, petrol endüstrileri ve atık su arıtma gibi geniş kullanım alanları mevcuttur (Van Hamme, 2006; Shikha, 2020; Shu ve ark., 2021).

Günümüzde çoğu uygulama kimyasal olarak sentezlenmiş yüzey aktif maddelerin kullanılmasını içermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünya genelinde yüzey aktif maddelerin üretimi sırasıyla yıllık olarak $3{,}4x10^9$ ve $7x10^9$ kg olarak tahmin edilmektedir. Sıklıkla kullanılan sentetik sürfektanlar, yaygın kullanımlarının yanı sıra ekotoksisiteleri, düşük biyolojik bozunurlukları ve petrol türevi olmaları ile de dikkat çekmektedir. Petrolün fazla tüketimi, kaynak tükenmesine ve çevre kirliliğine neden olmaktadır (Kosaric, 2001; Vieira ve ark., 2021).

Biyosürfektanlar, mikroorganizmaların sabit büyüme fazlarında üretilen ikincil metabolit bileşiklerdir (Fernandes ve ark., 2020). Hidrofilik kısımları karboksilar, karbonhidrat, aminoasit, siklik peptit veya alkolden oluşurken hidrofobik kısımları uzun zincirli yağ asitleri, hidroksi yağ asitleri veya α-alkil β-hidroksi yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu özellikleri sayesinde yüzeyaktif maddelerin arayüzey davranışını değiştirir, diğer moleküllerin arayüzeylerde çözelti içindeki davranış şeklini etkiler (Mandal ve ark., 2013). Antimikrobiyal aktivitelerinin yoğunluğu farklı faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerden en önemlisi test edilen mikroorganizmaların hücre duvarı yapısıdır. Biosürfektanlar genellikle Gram negatif mikroorganizmalardaki hücre duvar yapısının daha karmaşık olmasından dolayı Gram pozitif mikroorganizmalara daha etkilidir. Kesin mekanizması henüz belirlenememiş olsa da biyosürfektanların mikroorganizmaların hücre duvarına bağlanarak besin alımını bozduğu ve membranda yapısal değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir (Pal ve ark., 2023).

Biyosürfektanlar, aşırı pH, tuzluluk ve sıcaklık gibi koşullarda stabil kalabilmeleri gibi dikkat çekici fizikokimyasal özelliklere sahiptirler. Sentetik sürfektanlara eşdeğer veya daha düşük toksisiteye sahip olmaları, biyolojik atık oluşturmamaları ve hızlı biyolojik bozunabilirlikleri ile öne çıkmaktadırlar (Kosaric, 2001; Mnif ve ark., 2016).

Biyosürfektanlar; glikolipidler, lipopeptitler ve lipoproteinler, fosfoli-pidler ve yağ asitleri ile polimerik ve partiküler biyosürfektanlar şeklinde başlıca 5 grupta ele alınmaktadır. Biyosürfektanların etkinliği bileşimindeki maddelere göre değişiklik göstermektedir (Kaya ve ark., 2007; Özdefne, 2014). En yaygın çalışılan biyosürfektan grupları, surfaktin, fengisin ve itürin gibi lipopeptitler ve ramnolipid, soforolipidler, mannosileritritol lipidleri ve trehaloz lipidleri gibi glikolipidlerdir (Mandal ve ark., 2013).

Biyosürfektanların ekonomik olmamaları ve ürün çeşitliliğinin eksikliği tercih edilememelerinin önemli nedenleridir. Şu anda ticari olarak temin edilebilen biyosürfektanlar surfaktin, soforolipidler ve ramnolipidlerle oldukça sınırlıdır. Yeni biyosürfektanların keşfi yada teknolojik gelişmeler ile üretim maaliyetlerinin azaltılması ile kullanım miktarları artacaktır. Bu nedenle, yeni biyosürfektan üreten mikroorganizmaların keşfine yönelik çabaların artırılması gerekmektedir (Sen, 2010). Küresel nüfüs artışı, organik biyoaktif ürünlere artan talep, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve hammaddelerin kolay bulunabilirliği biyosürfektan satışlarının artmasında önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya çapında soforolipid pazarının büyüklüğü 2021 yılında 409,84 milyon ABD dolarıyken bu rakamın 2030 yılına kadar 644,21 milyon ABD dolarına ulaşması beklenmektedir (Pal ve ark., 2023).

Çalışmamızda biyosürfektan olarak ramnolipid ve soforolakton kullanılmıştır.

Soforolakton bir soforolipidtir. Soforolipidler glikolipid biyosürfektanlardır ve genel olarak biyosürfektanların başlıca özelliklerini taşımaktadırlar. Yapısal olarak hidrofobik ve hidrofilik alt birimlerden olaşmaktadır. Hidrofobik kısım, uzun kuyruk benzeri olan hidroksilaz yağ asidi ve hidrofilik kısım olarak soforoz içermektedir. Soforolipidler lipofilik maddelerin hücreler tarafından asimilasyonu yoluyla üretilen maddelerdir. Sekonder metabolitler olarak üretilirler. Başlıca *Starmerella bombicola*, *Wickerhamiella domericqiae*, *Candida bogoriensis*, *Candida bombicola* ve *Candida apicola* gibi patojen olmayan maya türleri tarafından sentezlenmektedir (Dhadwal ve ark., 2024).

Ramnolipidler glikolipid sürfektanlar içinde yer almaktadır. Ramnolipidler, fizikokimyasal özellikleri nedeniyle en çok çalışılan ve popüler olan glikolipid sınıfıdır. Ramnolipidler, farklı uzunluklarda doymuş veya doymamış nadiren bir veya iki yağ asidi kuyruğunu içeren hidrofobik bir kısma glikozidik bağ ile bağlanmış bir veya iki ramnoz grubundan oluşmaktadır. Ramnolipidler başlıca *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilmektedirler. Ramnolipidler amfifilik karakterleri, emülsifiye edici aktiviteleri ve yüzey ile ara yüzey gerilimlerini azaltarak farklı fazlar arasında birikme kabiliyetlerinin ötesinde, dış membranı katlama, antimikrobiyal, antikanser ve immünomodülasyon aktivitelerinin yanı sıra nanopartikül sentezleme kabiliyetine de sahiptirler (Azevedo ve ark., 2024; Kumar ve ark., 2021; Singh ve ark., 2019; Thakur ve ark., 2021; Daverey ve ark., 2021).

4.2. Propolis

Propolis, bal arılarının bitkilerden topladıkarı ve bir miktar bal mumu ekleyip enzimleriyle biyokimyasal değişiliğe uğratarak oluşturdukları reçinemsi bir maddedir. İçeriği toplandığı zamana ve çevredeki bitki çeşitliliğine göre değişiklik göstermektedir. Propolisin en bilinen özelliği kovan içerisinde mikrobiyolojik güvenliği sağlamasıdır. Bununla beraber kovandaki hasarların giderilmesinde kullanılmakta ve kovandaki sıcaklık ve nem koşullarının korunmasına yardım ettiği bilinmektedir (Polat ve ark., 2023; Bayatbalay G., 2021).

Propolis içerik olarak başlıca fenolik bileşikler, flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik asit esterleri gibi ana bileşenlerden oluşmaktadır. Propoliste bulunan yaklaşık olarak 300 adet bileşen tespit edilmiştir. Farklı coğrafyalardan toplanan propolislerin kimyasal yapılarının farklı olması, onların farklı biyolojik aktivite göstermelerine neden olurken değişik bölgelerden toplanan ve farklı kimyasal yapıya sahip olan propolislerin benzer biyolojik aktivite, antibakteriyel ve antifungal etki de gösterebilmektedir. Dolayısıyla propolisin antimikrobiyal özelliği, tüm dünyada propolisin üzerinde en çok çalışılan özelliği olmuştur (Doğan ve ark., 2012; Pimenta ve ark., 2015).

Doğal bir antibiyotik olarak ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilen propolis, biyolojik ve farmakolojik özellikleri açısından oldukça zengindir. Antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoa, antitümör, antiülser, antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri bunlardan bazılarıdır (Castaldo ve ark., 2002; Kutluca ve ark., 2008). Ayrıca literatürde kalp ve diyabet gibi kronik hastalıklar, kanser, ağız ve diş hastalıkları, viral hastalıklar, gastrointestinal, nörolojik ve deri hastalıklarında olumlu yönde etkisinin bulunduğu çalışmalara rastlanmaktadır.

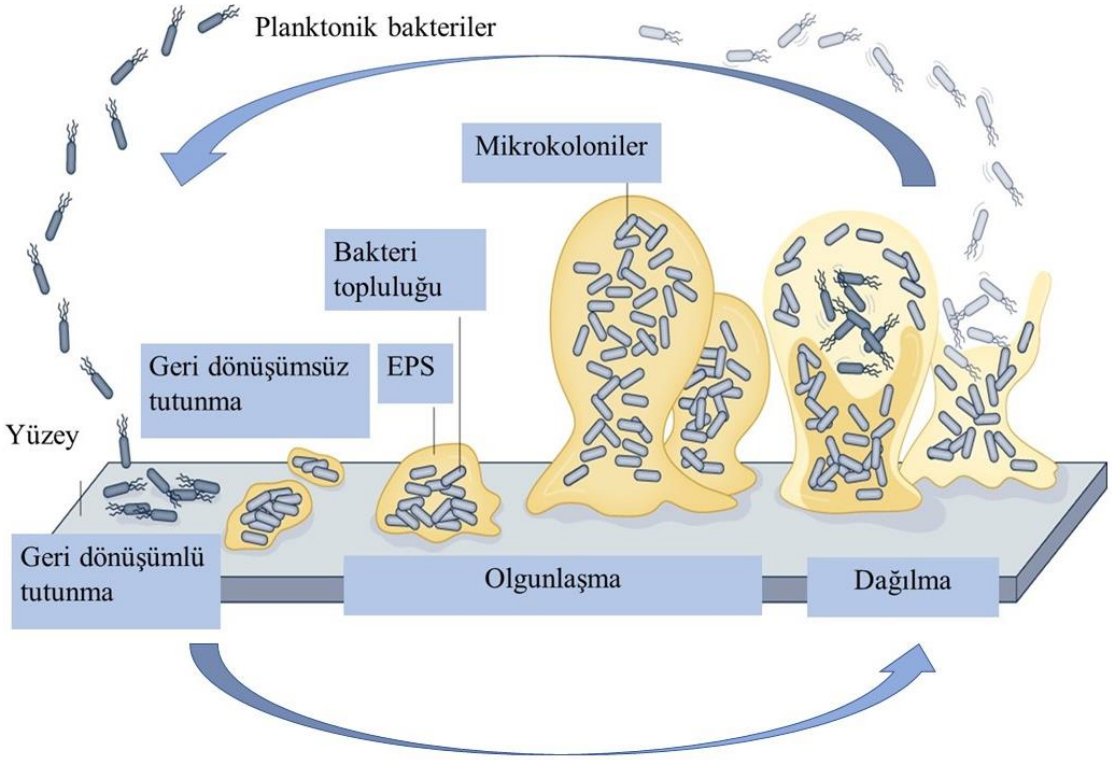
Propolis ilaç sektörü haricinde tıp, veterinerlik, gıda, tarım ve mobilyacılık sektörlerinde, apiterapi merkezlerinde, dermatolojik ve kozmetik uygulamalarda çok yönlü olarak kullanılmakta ve yeni özellikleri keşfedildikçe de kullanım alanları artmaktadır (Kösedağ, 2021; Uğur, 2021; Çekin, 2023).

4.3. Biyofilm

Biyofilm, mikroorganizmanın canlı cansız yüzeylerde kolonizasyonunu sağlayan polisakkarit bir yapıdır. Bakteriler içerisinde dış etkenlerden korunduğu gibi canlılığını sürdürüp sinyal moleküller salgılanması yolu ile birbirleri arasında haberleşebilir ve çoğalabilirler. Biyofilm içerisinde tek bir bakteri türü veya farklı bakteri türleri bir arada bulunabilir. National Institutes of Health ve Disease Control Merkezi tarafından yapılan bir araştırma, enfeksiyonların çoğunun (%65-80) biyofilm oluşumu nedeniyle meydana geldiğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla biyofilm enfeksiyonların en önemli kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir (Aktaş, 2010; Shikha ve ark., 2020, Sauer ve ark., 2022).

Biyofilm oluşumu bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel şartların etkilerinden ve ultraviyole ışığın doğuracağı zararlardan korur. Ortamdaki besin maddelerinin depolanmasını ve ortamdan uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Biyofilm yüzeyindeki bakteriler tabakalı dizilimleri sayesinde mekanik kalkan oluşturur. Ayrıca salgıladıkları katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri ile iç yüzeyde bulunan bakterileri korur. Ayrıca sağlam yapısı ile antimikrobiyallerin biyofilm içine yeterli konsantrasyonda ulaşmamasına neden olarak antimikrobiyal direncin gelişimine olanak sağlar. Bu durum enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi güçlüklere sebep olmaktadır. Ayrıca yok edilememesi durumunda vücutta enfeksiyon yayılımı için odak oluşturarak kronik enfeksiyon gelişimine destek olmaktadır (Rabin ve ark., 2015; Leitao ve ark., 2020).

Biyofilmin oluşumu, aşamalı bir süreçtir ve başlıca planktonik mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere geri dönüşümlü tutunması, geri dönüşümsüz tutunması, olgunlaşma ve sonrasında dağılma aşamalarını içermektedir. Mikroorgnaizma yüzeye tutunduktan sonra ekstra polimerik maddelerin üretimi ile hızla çoğalmaya başlar ve olgunlaşma aşaması başlamış olur. Olgunlaşmanın son aşamasında mikroorganizmalar mikrokoloniler oluşturur ve sonrasında ise biyofilm dağılma aşamasına gelmektedir. Dağılan biyofilmden dağılan mikroorganizmalar ortama yayılır ve temas ettiği yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturmaya devam eder (Şekil 1) (Rabin ve ark., 2015; Leitao ve ark., 2020; Sauer ve ark., 2022).



EPS : Ekstra polimerik madde

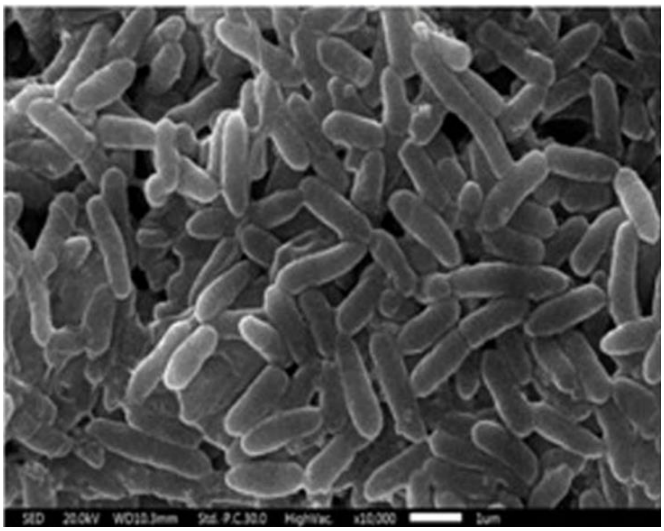
Şekil 1. Biyofilm gelişiminin aşamaları (Sauer ve ark., 2022 den değiştirilerek).

4.4. Çalışmada Yer Alan Patojen Mikroorganizmalar

4.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonadaceae ailesinde *Pseudomonas* cinsinin en iyi tanımlanan ve en çok çalışılan türüdür. Gram negatif ve çoğunlukla aerob bazı durumlarda anaerop bir bakteridir. 0,5-0,8 µm eninde 1,5-3 µm boyunda, çubuk şeklindedir (Şekil 2). Oksidaz pozitif olup spor oluşturmazlar. Uygun besiyerinde 30-37 °C de, pH 5,6-8,0 aralığında hafif alkali ortamda gelişebilir ve 42 °C de de üreyebilir. Flöresan özellikteki piyosiyanin ve piyoverdin pigmentlerini üretmektedir. Bu sayede alkali pH da mavi ve yeşilimsi renkte görünür. Katı besiyerinde yaklaşık 3,5 mm boyunda yuvarlak, yumuşak ve yassı koloniler şeklinde, kanlı agar besiyerinde düz, tüysü kenarlı, pürüzlü ve buzlu çam görünümünde gri renkli koloniler oluşturur. Virulans faktörü olarak birçok eksotoksin, hemolizin, lipaz, elastaz, proteaz ve alginat içeren kapsül yapısı bulunmaktadır. Ayrıca biyofilm geliştirme yetenekleri oldukça yüksektir. *P. aeruginosa* güçlü virulans faktörleri nedeni ile patojenitesi yüksek bir bakteridir. Biyofilm oluşturma yeteneğinin yüksek oluşu, beslenme gereksinimlerinin basitliği, geniş üreme sıcaklığı, farklı çevre

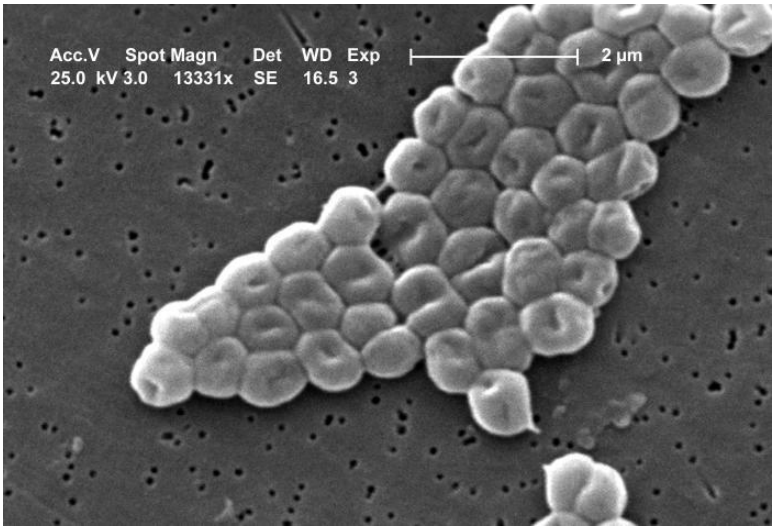
koşullarına dayanıklılığı, nemli ortamlarda kolay üreyebilmesi ve bir çok antibiyotiğe karşı dirençli olması nedeniyle sık karşılaşılmakta ve insan sağlığı açısından sorun oluşturmaktadır (Procorp ve ark., 2017; Qin ve ark., 2022; Jurado-Martín ve ark., 2021).



Şekil 2. *P. aeruginosa* ATCC 27853 SEM mikrografisi 10.000 x büyütme (Ko ve ark., 2017).

4.4.2. *Acinetobacter baumannii*

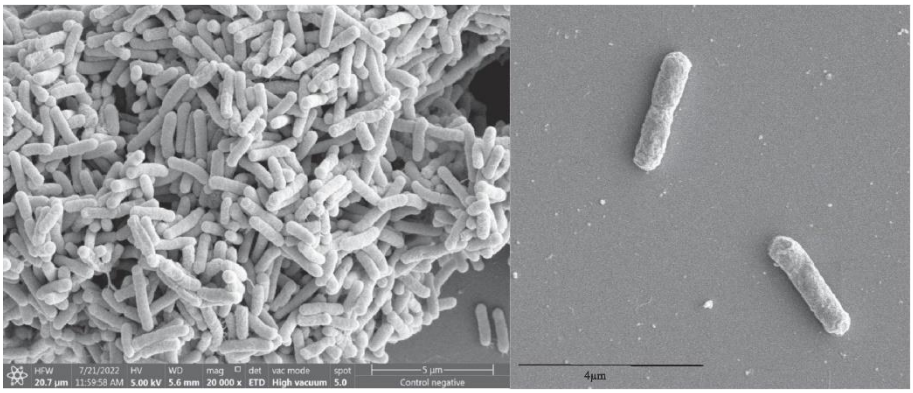
Moraxellaceae ailesinden *Acinetobacter* cinsine ait *Acinetobacter baumannii* Gram negatif, sporsuz, hareketsiz, kokobasil bakterilerdir. Gram boyamada yaşam döngüleriin evresine göre basil, kokobasil ve diplokok gibi farklı morfolojik özellik sergileyebilirler. 1,0-1,5 µm eninde 1,5-2,5 µm uzunluğundadırlar (Şekil 3). İnce kapsül oluşturabilirler. *Acinetobacter* ailesinin üreme sıcaklıkları 20-37 °C olmasına karşın *A. baumannii* 44 °C de de üreyebilme yeteneği ile diğer *Acinetobacter* türlerinden ayrılır. Rutin besiyerlerinde üreyebildikleri gibi koyun kanlı agarda 18-24 saatlik inkübasyon sonunda 0,5-2 mm çapında düzgün, mat veya saydam hafif kabarık S tipi koloniler oluştururlar. Oksidaz, deoksiribonükleaz ve indol negatif, katalaz pozitiftir. Virülans faktörleri K1 kapsül, fimbria, Lipit A, lipopolisakkarit yapı ve üreaz, esteraz, aminopeptidaz, fosfolipaz C enzimleridir. *A. baumannii* pnömöni, bakteriyemi, menenjit, yara ve idrar yolu enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara yol açabilen fırsatçı patojendir. Kimyasal madde ve kuru ortama direnç gösterebilirler. Kuru ve cansız yüzeyde beş ay kadar yaşayabildiklerinden kolonizasyon yaygındır. Hastane çalışanlarının ciltlerine kolonize olarak taşınan en yaygın Gram negatif bakterilerdir (Procorp ve ark., 2017; Afeke ve ark., 2022; Dehpanipour ve ark., 2022).



Şekil 3. *A. baumanni* SEM mikrografı, 3.0 kV altında 13331 x büyütme (CDC, 2025).

4.4.3 *Escherichia coli*

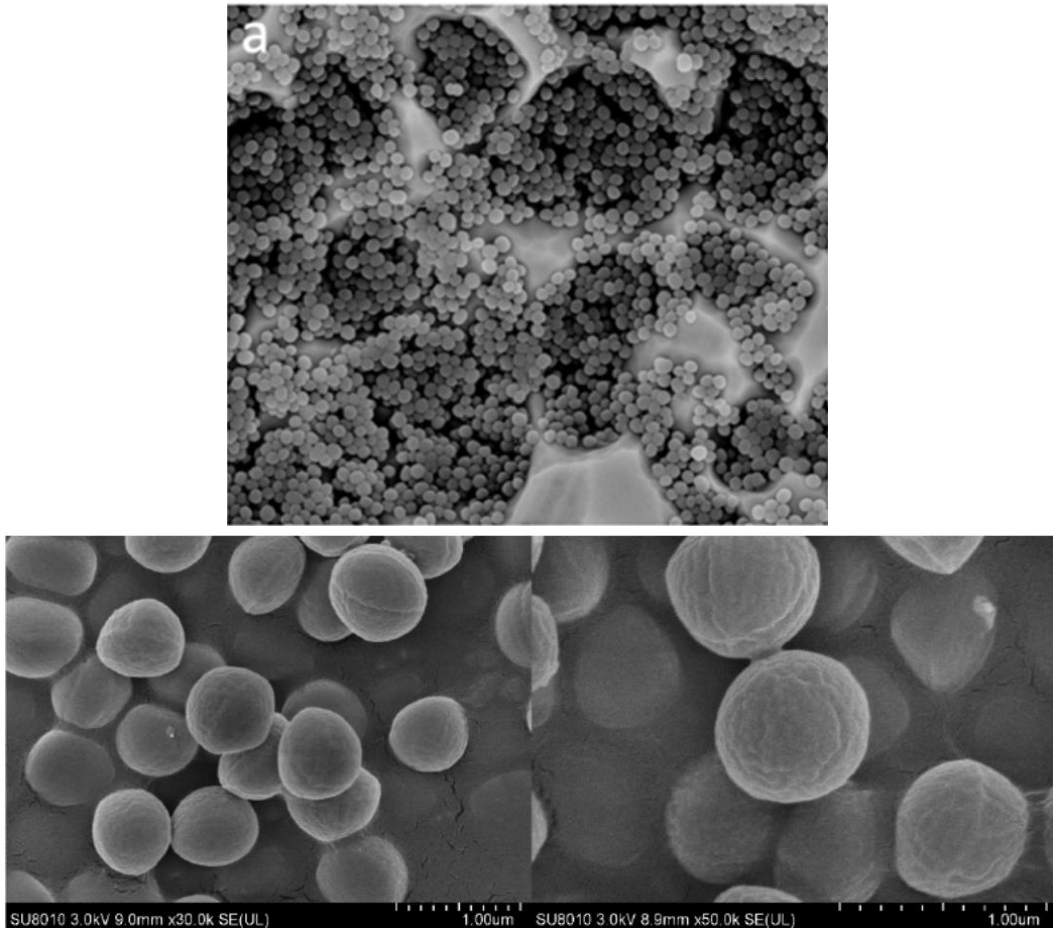
Enterobacteriaceae ailesinin *Escherichia* cinsine ait *Escherichia coli* fakültatif anaerop, Gram negatif, kirpkli, hareketli, sporsuz, basil bakterilerdir. 0,3-0,7 µm eninde 1,0-6 µm boyundadırlar (Şekil 4). Optimum sıcaklığı 37 °C ve optimal pH 7-7,2 dir. 18-45 °C ve pH 5-8 aralığında da canlılığını koruyabilir. Uygun besiyerinde ortası kabarık, düzgün kenarlı ve pigmentsiz S tipi koloni oluştururlar. Laktoz pozitif EMB agarda yeşil-metalik renk, MacConkey agarda kırmızı renk koloni oluştururlar. *E. coli* çok değişken bakteri türlerinden biridir. Gen kaybı veya kazanımı yoluyla genomu, ortam değişikliğine hızlı adapte olmasını sağlar. Bu nedenle insanlarda ve hayvanlarda halk sağlığı için önemli hastalıklar oluşturan patojen suşlar haline gelmişlerdir. Virülans faktörleri fimbrialar, adezinler, invazinler, aerobaktin sideforları, serum direnci, kolisin aktivitesi, kapsül polisakkaritleri ve enterotoksin, nörotoksin, endotoksin, hemolizin gibi toksinlerdir. *E. coli* bağırsak mikroflorasının en yaygın aerob bakterisidir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından listelenen 12 antibiyotik dirençli "öncelikli patojen" arasında üçüncü sıraya yükselmekte ve antibiyotiklere daha fazla direnç kazanmaktadır. Etkeni olduğu başlıca enfeksiyonlar, idrar yolu enfeksiyonu, yenidoğan menenjiti, sepsis, ürosepsis, hastane kökenli pnömoniler, deri yumuşak doku enfeksiyonlarıdır (Procorp ve ark., 2017; Martinson ve ark., 2020; Pakbin ve ark., 2021).



Şekil 4. *E. coli* ATCC 25922 FESEM mikrografı, 5.0 kV altında 20.000 x ve 30.000 x büyütme (Hendri ve ark., 2024).

4.4.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcacae ailesinin *Staphylococcus* cinsi içerisinde tespit edilmiş en önemli insan patojeni *Staphylococcus aureus* ‘tur. Gram pozitif, sporsuz ve hareketsiz, aerobik veya anaerobik, ikili, üçlü, dörtlü veya çoklu salkım şeklinde bir arada bulunan 0,5-1,5 µm çapında koklardır (Şekil 5). 18-40 37 °C de ve 4-6 pH aralığında çoğalabilirler. Genel besiyerinde olduğu gibi tuz konsantrasyonu yüksek besiyerlerinde de üreyebilir. Çoğunlukla S tipi, altın sarısı yuvarlak, kabarık kloniler oluştururlar. Kanlı agarda düzgün, düşük konveks, açık beta hemoliz halkası açığa çıkaran 1-4 mm çapında koloniler oluştururlar. Başlıca virülans faktörleri kapsüler polisakkarit, Protein A, teikoik asit, peptidoglikan, katalaz, koagülaz, β – laktamaz, hyalüronidaz, lipaz, nükleaz, enterotoksin, epidermolitik toksin, sitotoksin ve toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1) dir. *S. aureus* normal deri florasının bir üyesi iken, kan dolaşımı veya iç organlara yayıldığında ciddi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. *S. aureus* insanlarda en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biridir ve bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomiyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları, akciğer enfeksiyonları (pnömoni ve ampiyem gibi), gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu ve idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olabilir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) gibi çoklu antibiyotik dirençleri tedaviyi zorlaştırmaktadır. MRSA, Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşlarından farklı olarak 7 adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulundurur. MRSA, MSSA‘dan farklı olarak yeni oluşan PBP2c proteini sayesinde beta-laktam yapıdaki antibiyotiklere karşı düşük afinitede bağlanma özelliği gösterir (Procorp ve ark., 2017; Cheung ve ark., 2021; Ahmad-Mansour ve ark., 2021).

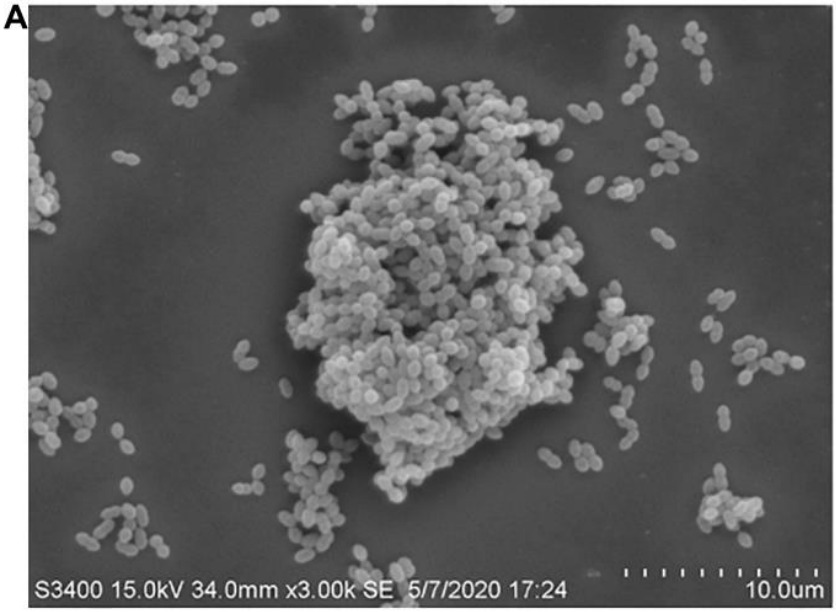


Şekil 5. (a) *S. aureus* ATCC 29213 SEM mikrografı 8.000 x büyütme (Martinez ve ark. 2021). (b) *S. aureus* ATCC 43300 SEM mikrografı 3.0 kV altında 30.000 x büyütme (Shu ve ark. 2020).

4.4.5 *Enterococcus faecalis*

Enterococcaceae ailesininden *Enterococcus* cinsine ait *Enterococcus faecalis*, Gram pozitif, 0,6-2,5 µm çapında tekli, ikili veya kısa zincirli kok ya da nadiren kokobasil şeklinde, katalaz negatif, sporsuz, çoğunlukla hareketsiz ve fakültatif anaerob bakterilerdir (Şekil 6). Alfa, beta veya gama hemoliz oluşturabilirler. Genel besiyerlerinde çoğalabildikleri gibi, koyun kanlı agarda 1-2 mm büyüklüğünde gri, parlak ve buğulu koloniler oluştururlar. Karbonhidratları laktik aside indirgemeleri nedeniyle tipik laktik asit bakterieri olarak değerlendirilirler. Optimal üreme sıcaklıkları 10-45 °C gibi geniş bir ısı aralığında üreyebilirler. Ayrıca 60°C de 30 dakikaya kadar dayanıklı olduğu görülmüştür. Başlıca virülans faktörleri agresyon faktörü, ekstraselüler yüzey proteini, ekstraselüler süperoksit, *Enterococcus faecalis* Antijen A (EfaA) proteini, hemolizinler, jelatinaz, sitolizin ve hyaluronidazdır. Fırsatçı patojen olan *E. faecalis* 'in başlıca etkeni olduğu enfeksiyonlar üriner sistem enfeksiyonları, ürosepsis, endokardit,

bakteriyemi, pelvik enfeksiyonlar, yara ve yumuşak doku enfeksiyonları, menenjit, nozokomiyal enfeksiyonlar (Procorp ve ark., 2017; Herrera-Hidalgo ve ark., 2020; Beganovic ve ark., 2018; Herrera-Hidalgo ve ark., 2020).



Şekil 6. *E. faecalis* SEM mikrografı 15.0 kV altında 3.000 x büyütme (She ve ark., 2021).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Mikroorganizmalar

Çalışmamızda *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 29212, *A. baumannii* ATCC 19606, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. aeruginosa* PAO1 standart suşları ile enfeksiyon etkeni olarak tespit edilen, *Escherichia coli* (22 adet), *Pseudomonas aeruginosa* (20 adet), Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) (22 adet), Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (22 adet), *Enterococcus faecalis* (21 adet) ve *Acinetobacter baumannii* (20 adet) izolatları ile kontrol mikroorganizmaları olarak *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* PAO1, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *A. baumannii* ATCC 19606 kullanılmıştır.

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Estitüsü Etik Kurulu tarafından 18.02.2019 tarihli ve 51 sayılı karar ile onaylanmıştır (EK1). Klinik izolatlar, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen rutin örneklerden, MALDI-TOF MS ile tanımlanarak temin edilmiştir. Çalışmada yer alan klinik suşlar ve izole edildiği örnekler Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan klinik suşlar ve izole edildiği klinik örnekler

MRSA İzolatları	**MSSA İzolatları**	***E. faecalis* İzolatları**	***A. baumannii* İzolatları**	***E. coli* İzolatları**	***P. aeruginosa* İzolatları**
MR-1 Yara	MS-1 Kan	Ef-1 Kan	Ab-1 Balgam	Ec-1 Kan	Pa-1 Yara
MR-2 Abse	MS-2 Kan	Ef-2 Kan	Ab-2 Trakeal aspirat	Ec-2 Balgam	Pa-2 Trakeal aspirat
MR-3 Yara	MS-3 Balgam	Ef-3 Dışkı	Ab-3 Balgam	Ec-3 Abse	Pa-3 Trakeal aspirat
MR-4 Balgam	MS-4 Yara	Ef-4 İdrar	Ab-4 Balgam	Ec-4 Yara	Pa-4 İdrar
MR-5 yara	MS-5 Kan	Ef-5 Kan	Ab-5 Kan	Ec-5 Balgam	Pa-5 Yara
MR-6 Etest	MS-6 Burun	Ef-6 Yara	Ab-6 Trakeal aspirat	Ec-6 Abse	Pa-6 Kan

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

Tablo 1. Çalışmada kullanılan klinik suşlar ve izole edildiği örnekler (Devam).

MRSA İzolatları	**MSSA İzolatları**	***E. faecalis* İzolatları**	***A. baumannii* İzolatları**	***E. coli* İzolatları**	***P. aeruginosa* İzolatları**
MR-7 Doku	MS-7 Yara	Ef-7 Kan	Ab-7 Periton	Ec-7 Doku	Pa-7 Katater ucu
MR-8 Kan	MS-8 Yara	Ef-8 İdrar	Ab-8 Trakeal aspirat	Ec-8 Kan	Pa-8 Trakeal aspirat
MR-9 Kan	MS-9 Yara	Ef-9 Doku	Ab-9 Trakeal aspirat	Ec-9 Kan	Pa-9 Balgam
MR-10 Yara	MS-10 Yara	Ef-10 Doku	Ab-10 Trakeal aspirat	Ec-10 Kan	Pa-10 Trakeal aspirat
MR-11 Doku	MS-11 Kan	Ef-11 Kan	Ab-11 Trakeal aspirat	Ec-11 İdrar	Pa-11 Trakeal aspirat
MR-12 Trakeal aspirat	MS-12 Doku	Ef-12 İdrar	Ab-12 Kan	Ec-12 İdrar	Pa-12 Yara
MR-13 Yara	MS-13 Kan	Ef-13 İdrar	Ab-13 Trakeal aspirat	Ec-13 İdrar	Pa-13 katater
MR-14 Trakeal aspirat	MS-14 Kan	Ef-14 İdrar	Ab-14 Trakeal aspirat	Ec-14 İdrar	Pa-14 Trakeal aspirat
MR-15 Kan	MS-15 Kan	Ef-15 İdrar	Ab-15 Trakeal aspirat	Ec-15 İdrar	Pa-15 Balgam
MR-16 Aspirat	MS-16 Trakeal aspirat	Ef-16 İdrar	Ab-16 Trakeal aspirat	Ec-16 Kan	Pa-16 Balgam
MR-17 Yara	MS-17 İdrar	Ef-17 Kan	Ab-17 Kan	Ec-17 Kan	Pa-17 Kan
MR-18 Balgam	MS-18 Eklem sıvısı	Ef-18 Kan	Ab-18 Trakeal aspirat	Ec-18 İdrar	Pa-18 Kan
MR-19 Balgam	MS-19 Kan	Ef-19 Kan	Ab-19 Kan	Ec-19 İdrar	Pa-19 Kan
MR-20 Kan	MS-20 Kan	Ef-20 Kan	Ab-20 Trakeal aspirat	Ec-20 İdrar	Pa-20 Doku
MR-21 Abse	MS-21 Trakeal aspirat	Ef-21 Kan		Ec-21 İdrar	
MR-22 Yara	MS-22 Kan			Ec-22 İdrar	

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

5.1.2. Propolisler

Propolis örnekleri İstanbul Bal Evi'nin kurucusu Mustafa Toktaş vasıtası ile ülkemizin 10 farklı ilinden temin edilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan propolis örnekleri ve toplandığı bölgeler

Örnek No	Toplandığı İl	Örnek No	Toplandığı İl
P1	Adana	P6	Hatay
P2	Düzce	P7	Kocaeli
P3	Edirne	P8	Muğla
P4	Erzincan	P9	Ordu
P5	Gaziantep	P10	Tekirdağ

5.1.3. Biyosürfektanlar

Ramnolipid AGAE R90

Soforolakton Cayman 14718

5.1.4. Besiyeri ve katkıları

Mineral salt medium

Aşağıdaki içerik tartılmış ve distile su ile 1 lt ye tamamlanarak otoklavda 121 °C de 15 dk. steril edilmiştir.

Madde	Miktar (g/L)	Madde	Miktar (g/L)
$K_2HPO_4.3H_2O$	4.8	$CaCl_2.2H_2O$	0.002
KH_2PO_4	1.5	$MnCl_2.4H_2O$	0.0004
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	$NiCl_2.6H_2O$	0.0004
$Na_3(C_6H_5O_7).2H_2O$	0.5	$ZnSO_4.7H_2O$	0.0004
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	$FeCl_3.6H_2O$	0.0002
Maya ekstraktı	0.1	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0002

Mueller Hinton agar Merck 70191

Ticari olarak temin edilerek, üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

Mueller Hinton broth 2 Merck 90922

Ticari olarak temin edilerek, üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

Tryptic soy agar Merck 1.05458

Ticari olarak temin edilerek, üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

Tryptic soy broth Merck 1.05459

Ticari olarak temin edilerek üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Propolis ekstraktlarının hazırlanması

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 10 çeşit propolis, her birinden ayrı ayrı 30 g tartıldı, %96 lık etil alkol eklenerek 100 mL ye tamamlandı. Karanlık ortamda 37 °C'de hergün çalkalanarak bekletildi. Karışım süzülerek tortusundan ayrıldı ve vakum evaporatör ile alkolü uzaklaştırılarak -20 °C'de muhafaza edildi (Kaya ve ark., 2012).

5.2.2. Biyosürfektan oluşumunun tespiti

Çalışmada referans mikroorganizma olarak *P. aeruginosa* ATCC 10145 ve *P. aeruginosa* nın 10 klinik suşu kullanılmıştır. Daha önce hazırlanan stok kültürleri kullanılarak mikroorganizmalar steril mineral salt medium (MSM) kültürlerine aktarılmıştır. Bu amaçla tüm izolatlardan steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde Mc Farland 2 bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklıkta bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan MSM besiyerlerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon, 35 °C'de 10 gün süre ile 150 rpm da çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma kültürlerinde biyosürfektan üretiminin belirlenmesi için Bodour ve arkadaşlarının kullandığı "drop-collapse" (damla çökmesi) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için 96 kuyucuklu mikro plaklar kullanılmıştır. Kültürler 10000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenmiş, santrifüjleme sonrasında süpernant filtre edilmiştir. Elde edilen son filtrat biyosürfektan varlığı için test sıvısı, steril su ve ekim yapılmamış besiyeri ise kontrol sıvısı olarak kullanılmıştır. Drop-collapse yöntemi için ilk olarak kuyucuklar 7 µL mineral yağ ile kaplanmıştır ve bir gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Test ve kontrol sıvılarından alınan 25 µL'lik örnekler 45°'lik açı ile kuyucuklara damlatılmıştır. Yağ ile kaplanmış kuyucuklarda damlaların çökme, yayılma ya da stabil kalma

durumları gözlenerek biyosürfektan varlığı değerlendirilmiştir (Bodour ve ark., 1998; Demirdöğen, 2012).

5.2.3. Biyofilm oluşumunun tespiti

Klinik izolatların biyofilm oluşturma kapasitelerinin tespit edilerek bunlar içinden çalışmalarda kullanmak amacı ile en güçlü biyofilm oluşturan izolatlar seçilmiştir. Bu amaç için her bir klinik izolat 3 mL %1 glikoz içeren steril TSB besiyerine ekilerek 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Kültürler steril %1 glikozlu TSB besiyerinde McFarland 0,5 standart bulanıklığına göre ayarlanıp 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklara, 100 er µL ve 3 tekrarlı olarak dağıtılmış, kuyucukların üzerine 100 er µL steril %1 glikozlu TSB eklenerek 1/2 oranında dilüe edilmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarına 200 µL steril %1 glikozlu TSB konmuştur. Plaklar 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plaklar otomatik pipet yardımı ile tabana değmeden boşaltılıp 200 µL PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından 200 µL %99 luk matanol eklenip 15 dk bekletilmiş ve boşaltılarak kurutulmuştur. Kuruyan kuyucuklara 200 µL % 0,1 lik kristal viyole eklenip 5 dk bekletilmiş ardından boya su ile yıkanarak uzaklaştırılarak kurutulmuştur. Kuyucuklara 200 µL %96 lık etanol eklenerek 30 dk kapak kapalı beklenip süre sonunda 595 nm dalga boyundaki plak okuyucuda okutulmuştur (Yıldırım, 2017).

Sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

Eşik değer = Negatif kontrol kuyucuklarının OD ortalaması + 3 x standart sapma değeri.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre güçlü, orta, zayıf ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

4 x Eşik değer < OD_M ise	Güçlü biyofilm
2 x Eşik değer < $OD_M \leq$ 4 x Eşik değer	Orta dereceli biyofilm
Eşik değer < $OD_M \leq$ 2 x Eşik değer	Zayıf biyofilm
$OD_M \leq$ Eşik değer	Negatif

OD_M : Optik dansite ortalaması.

5.2.4. Örneklerin hazırlanması

5.2.4.1. Propolis örneklerinin hazırlanması

Propolisler DMSO içerisinde çözdürülerek kullanılmıştır. -20 °C de muhafaza edilen propolisler spatül yardımı ile kazınarak 500 mg tartılıp ependorf tüplere alınmış ve 1500 µL ye kadar üzeri DMSO ile tamamlanmıştır. Hazırlanan propolis örneklerinin son konsantrasyonu 333,33 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.2.4.2. Ramnolipidin hazırlanması

Ramnolipidin çözündürülmesinde %96'lık etil alkol kullanılmıştır. Ramnolipid 500 mg tartılıp ependorf tüplere alınmış üzerine etil alkol eklenerek hacim 1500 µL ye tamamlanmıştır. Hazırlanan ramnolipid örneklerinin son konsantrasyonu 333,33 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.2.4.3. Soforolaktonun hazırlanması

Soforolaktonun çözdürülmesinde %96 lık etil alkol kullanılmıştır. Soforolakton içerisinden 100 mg tartılıp ependorf tüpüne alınmış ve üzeri etil alkol ile 1500 µL ye tamamlanmıştır. Hazırlanan soforolakton örneklerinin son konsantrasyonu 66,66 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.2.4.4. Meropenem stok çözeltisinin hazırlanması

Meropenem stok çözeltisi aşağıda verilen formüle göre hazırlanmıştır.

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

Elde edilen son konsantrasyon 1280 µg/mL dir.

5.2.5. Propolis ve biyosürfektanların oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinliğin tespiti

Taze kültürlerden alınan mikroorganizmalar koloni süspansiyonu yöntemi kullanılarak serum fizyolojik içerisinde McFarland 0,5 standart bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Hazırlanan

süspansiyonlar steril pamuk uçlu eküvyon yardımı ile fazla sıvı uzaklaştırılarak Mueller Hinton agar (MHA) besiyeri içeren petrilere üç yönde yayılmıştır. Petrilerde uygun aralıklar ile 5 mm çapında oluklar açılarak içerisine 50 µL hazırlanan örneklerden eklenmiştir. Kontrol olarak serum fizyolojik ve meropenem kullanılmıştır. Meropenem için her petride tek oluk açılmıştır. Petriler 37 °C de 24 saat inkübe edilmiş ve inhihibisyon zonları dijital kumpas ile mm cinsinden ölçülmüştür (EUCAST, 2015, Perez ve ark., 1990). Çalışmalar 3 tekrarlı gerçekleştirilerek aritmetik ortalamaları alınmıştır.

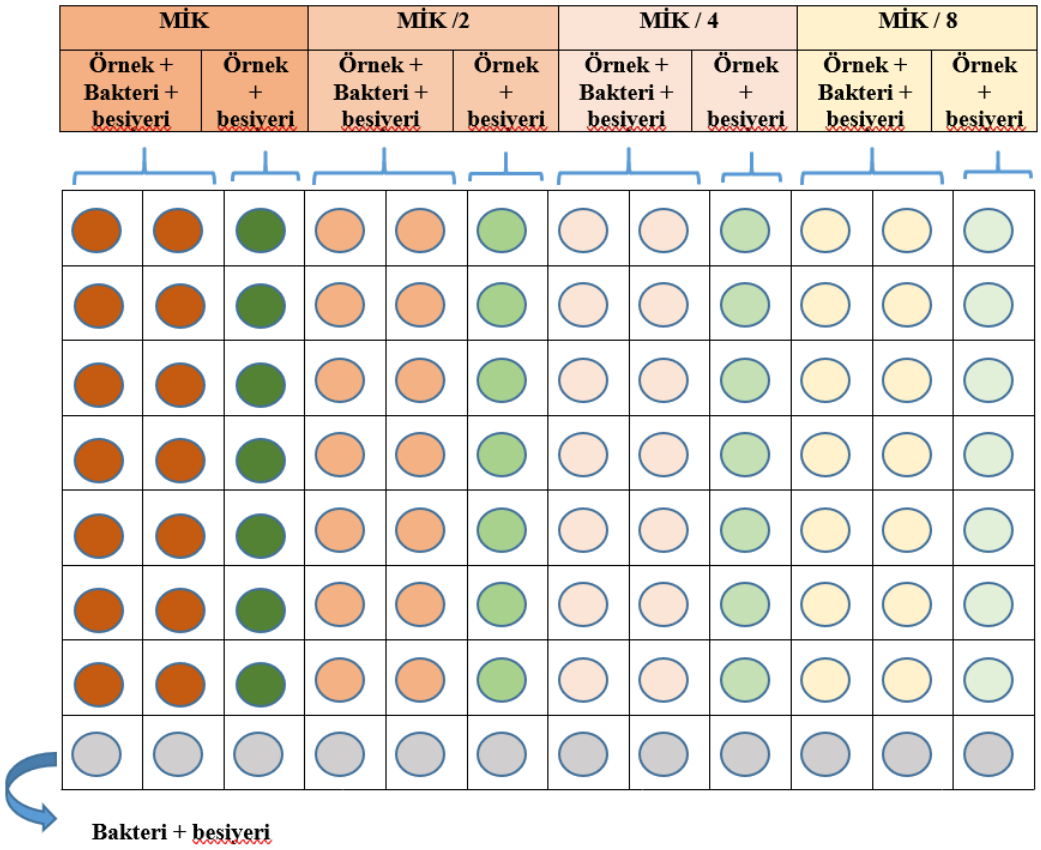
5.2.6. Propolis ve biyosürfektanların minimum inhibitör konsantrasyon ve minumum bakterisidal konsantrasyonun tespiti

Propolis örnekleri, ramnolipid ve soforolaktonun minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesinde mikrodilisyon yöntemi kullanılmıştır. Meropenem stok çözeltisi 1/10 sulandırılarak son konsantrasyon 128 µg/mL ye ayarlanmış, diğer örnekler de sırası ile propolis 333,33 µg/mL, ramnolipid 333,33 µg/mL ve soforolakton 66,66 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Steril 96 kuyucuklu U tabanlı mikro plakların tüm kuyucukları 100 µL katyon ayarlı Mueller Hinton broth (KAMHB) besiyeri ile doldururulnuştur. Ardından 1. sütuna sırası ile propolis, ramnolipid ve soforolakton örnekleri eklenip, 1. sütundan 11. sütüna kadar seri dilüsyon yapılmış ve 12. sütun mikroorganizma kontrolü amaçlı boş bırakılmıştır. Kontrol olarak DMSO, etil alkol ve KAMHB kullanılmıştır. Son olarak KAMHB içerisinde 5 x 10^5 kob/mL konsantrasyonunda hazırlanan mikroorganizma süspansiyonları tüm kuyucuklara 5 er µL eklenmiştir. Mikroplaklar 35 °C de 18-24 saat inkübe edildikten sonra koyu tema üzerinde ışık altında gözlenerek üreme olmayan kuyucuklar MİK değeri olarak belirlenmiştir (ISO; 2019). Propolis ve biyosürfektanların partiküllü yapılarından dolayı mikroorganizma üremesinin ayırt edilemediği durumlarda ve minimum bakterisidal konsantrasyonun tespiti için kuyucuklardan tryptic soy agar besiyerine 5µL ekim yapılarak 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Besiyerlerinde üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon minmum bakterisidal konsantrasyon (MBK) olarak kabul edilmiştir (Yılmaz, 2022). Çalışmalar 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

5.2.7. Propolis ve biyosürfektanların biyofilm oluşumu üzerine olan etkinliğin tespiti

Propolisler, ramnolipid, soforolaktonun 2MİK, MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonları halinde stok olarak hazırlanmıştır. Kontrol amacıyla DMSO ve etil alkol de aynı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Mikroorganizmaların taze kültürlerinden, fizyolojik tuzlu su

içerisinde McFarland 0,5 bulanıklık standartına göre hazırlanan mikroorganizmalar 1/100 oranında %1 glikozlu TSB besiyerinde seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklarda her satır bir mikroorganizma için 3 tekrarlı olacak şekilde örneklerin son konsantrasyonları MİK, MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 olacak şekilde gruplandırılmış son 3 kuyucuk pozitif kontrol için ayrılmıştır. İlk 2 kuyucuğa 100 µL mikroorganizmalı besiyeri, 3. kuyucuğa 100 µL steril besiyeri konulmuştur. Burada yapılan kontrol, partiküllü yapıya sahip olan propolisin tabanda birikme oranını tespit ederek mikroorganizma + propolis okumasında sadece mikroorganizma değerini bulmak için yapılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Biyofilm oluşumunun inhibisyonunun tespitinde kullanılan deney şablonu

Kuyucukların üzerine istenilen son konsantrasyonun iki katı halinde hazırlanmış örneklerden 100 er µL ilave edilip mikroplaklar streçlenerek 37 °C de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından kuyucuklar otomatik pipet yardımıyla tabana değmeden dikkatlice boşaltılıp 200 µL PBS ile 2 kez yıkanmış ardından kuyucuklara 200 µL %99 luk metanol eklenip 15 dk bekletilmiştir. Metanol uzaklaştırılıp kurutulan mikroplaklara 200 µL %0,1 lik kristal viyole eklenip 5 dk daha bekletilmiş ardından boyanın fazlası su ile

uzaklaştırılarak kuyucuklara 200 µL %96 lık etil alkol ilave edilmiş 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda mikroplaklar 595 nm dalga boyunda mikroplak okuyucuda okutulmuştur. Çalışma 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen biyofilm inhibisyon değerleri en yakın tam sayıya yuvarlanmış ve standart sapmaları hesaplanarak verilmiştir. İnhibisyon etkinliği görülmeyen sonuçlar 0 değeri ile gösterilmiştir. Sonuçlar propolis örnekleri için,

$$\text{Biyofilm inhibisyon oranı} = 100 - \left[\frac{(OD_D - OD_P)}{OD_K} \times 100 \right]$$

formülüne göre, diğer örnekler içinse aşağıda verilen formülasyona göre değerlendirilmiştir (Christensen ve ark., 1985; Dosler ve ark., 2014; Nostra ve ark., 2007; Yıldırım, 2017).

$$\text{Biyofilm inhibisyon oranı} = 100 - \frac{(OD_D \times 100)}{OD_K}$$

OD_D = Örnek eklenen kuyucukların optik dansite ortalaması
OD_K = Pozitif kontrol kuyucuğunun optik dansite ortalaması
OD_P = Steril besiyeri ve propolis örneği eklenen kuyucuğun optik dansitesi

5.2.8. Propolis ve biyosürfektanların minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonunun (MBEK) tespiti

Mikroorganimaların taze kültürleri McFarland 0,5 standart bulanıklığına göre ayarlanıp son konsantrasyon $5x10^7$ kob/mL olacak şekilde %1 glikozlu TSB besiyerinde sulandırılmış ve 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklara 200 µL dağıtılıp plaklar 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklar otomatik pipet yardımıyla tabana değmeden dikkatlice boşaltılıp 200 µL PBS ile 2 kez yıkanmış üzerlerine 200 µL PBS eklenerek mikropipet ucu yardımıyla kuyucukların dibindeki tabaka kazınmıştır. Kuyucuklardan 5 er µL süspansiyon alınarak TSA petrilerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu olarak değerlendirilmiştir (Dosler ver ark., 2014; Yıldırım, 2017). Çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Biyosürfektan Oluşumunun Tespiti

Çalışmamızda biyosürfektan üretiminin tespiti için *P. aeruginosa* ATCC 10145 ve *P. aeruginosa* nın 10 klinik suşu kullanılmıştır. Elde edilen sıvı madde drop-collapse yöntemine göre değerlendirilmiş olup tüm suşlarda biyosürfektan üretimi tespit edilmemiştir.

6.2. Klinik İzolatların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

Tabloda görüldüğü gibi *E. coli* izolatları dışındaki tüm klinik izolat gruplarında biyofilm gelişebildiği görülmektedir. Biyofilm oluşturma gücünün ise sırası ile *S. aureus*, *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* izolatlarında daha güçlü ve oranının daha yüksek olduğu tespit edişmiştir. Tüm izolatlar içinde *E. coli* izolatlarında ise biyofilm geliştirme yeteneklerinin genel olarak daha zayıf olduğu ve bazı izolatların test yöntemine göre biyofilm gelişiminin olmadığı görülmüştür (Tablo 3). Bu sonuçlar neticesinde biyofilm gelişiminin en yüksek seviyede olduğu klinik izolatlar olan *P. aeruginosa* Pa10, *A. baumannii* Ab10, *S. aureus* MR20, *S. aureus* MS20, *E. coli* Ec20 ve *E. faecalis* Ef 20 izolatları sonraki deneyler için seçilmiştir.

Tablo 3. Klinik izolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri

Mikroorganizma	Toplam izolat sayısı	Biyofilm oluşturma yüzdesi (%)	Biyofilm oluşturma kapasitesi			
			Güçlü	Orta	Zayıf	Negatif
E. coli	22	63,3	0	1	13	8
P. aeruginosa	20	100	10	7	3	0
MSSA	22	100	19	1	2	0
MRSA	22	100	19	3	0	0
E. faecalis	21	100	17	2	2	0
A. baumannii	20	100	2	7	11	0

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

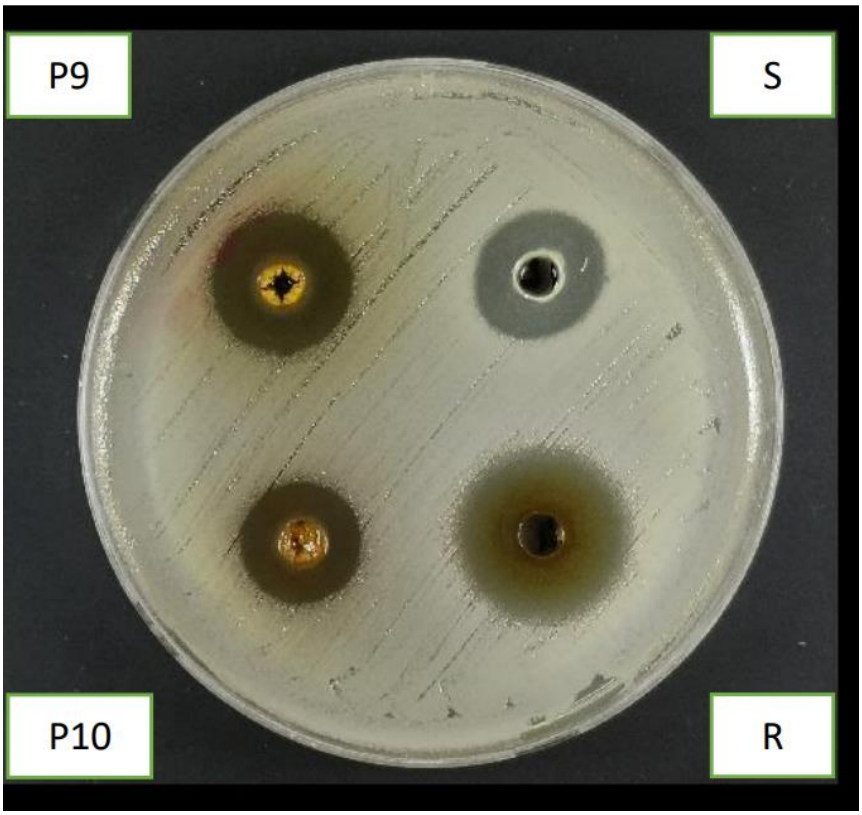
6.3. Propolis ve Biyosürfektanların Oluk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinliğin Tespiti

Oluk difüzyon yöntemi ile propolis örneklerinin, ramnolipid ve soforolaktonun standart ve klinik izolatlar üzerine olan antikrobiyal etkinliği tablo 4'te görülmektedir. Sonuçlara göre propolis örneklerinin ve biyosürfektanların özellikle Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu görülmektedir. Bunun yanında bazı propolis örneklerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606, Klinik *A. baumannii* olan Ab10 izolatı üzerine, ramnolipid ve soforolaktonun *A. baumannii* ATCC 19606 üzerine ve soforolaktonun *P. aeruginosa* PAO1 üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer mikroorganizmalara karşı oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinlik saptanmamıştır (Tablo 4, Şekil 8).

Tablo 4. Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların antimikrobiyal etkinliği

Örnek	Zon çapı (mm)												
	Pa. ATCC 27853	**Pa PAO1**	**Pa Pa 10**	**Ab ATCC 19606**	**Ab Ab 10**	**Ec ATCC 25922**	**Ec Ec 20**	**Sa ATCC 43300**	**Sa MR 20**	**Sa ATCC 29213**	**Sa MS 20**	**Ef ATCC 29212**	**Ef Ef 20**
P 1	7,7 ±0,15	0	0	0	8,85 ±0,12	0	0	8,36 ±0,11	8,96 ±0,12	8,30 ±0,12	9,37 ±0,19	9,6 ±0,14	10,45 ±0,13
P 2	0	0	0	0	0	0	0	15,95 ±0,30	12,22 ±0,33	15,30 ±0,31	15,36 ±0,14	11,05 ±0,29	12,05 ±0,22
P 3	0	0	0	0	0	0	0	15,95 ±0,18	12,93 ±0,32	14,61 ±0,13	14,53 ±0,13	11,30 ±0,26	9,90 ±0,10
P 4	8,1 ±0,09	0	0	0	0	0	0	16,85 ±0,19	13,40 ±0,26	16,48 ±0,22	14,09 ±0,31	12,20 ±0,28	11,94 ±0,09
P 5	0	0	0	0	0	0	0	8,51 ±0,17	7,6 ±0,16	9,12 ±0,11	7,85 ±0,18	8,40 ±0,14	0
P 6	0	0	0	8,23 ±0,13	8,03 ±0,29	0	0	15,38 ±0,10	12,46 ±0,09	15,47 ±0,27	14,20 ±0,26	11,7 ±0,27	10,94 ±0,11
P 7	0	0	0	8,19 ±0,19	7,71 ±0,11	0	0	17,01 ±0,30	13,85 ±0,22	15,80 ±0,15	15,50 ±0,16	12,5 ±0,09	12,19 ±0,17
P 8	0	0	0	0	0	0	0	15,68 ±0,15	13,6 ±0,14	14,81 ±0,24	14,38 ±0,13	10,75 ±0,23	11,73 ±0,14
P 9	0	0	0	0	0	0	0	17,85 ±0,15	16,12 ±0,19	18,12 ±0,15	17,60 ±0,23	14,84 ±0,32	13,82 ±0,34
P 10	0	0	0	0	8,15 ±0,11	0	0	16,16 ±0,33	13,53 ±0,16	15,18 ±0,30	15,33 ±0,12	12,35 ±0,18	11,0 ±0,22
R	0	0	0	7,23 ±0,11	0	0	0	23,61 ±0,14	19,01 ±0,2	21,07 ±0,21	20,95 ±0,0,10	8,32 ±0,09	0
S	0	7,67 ±0,18	0	12,88 ±0,23	0	0	0	15,6 ±0,25	14,9 ±0,22	16,45 ±0,26	15,15 ±0,26	13,95 ±0,11	12,17 ±0,13

Pa: *P. aeruginosa*, Ab: *A. baumannii*, Ec: *E. coli*, Sa: *S. aureus*, Ef: *E. faecalis*, P: Propolis, R: Ramnolipid, S: Soforolakton



Şekil 8. *S. aureus* MS20 klinik izolatı üzerine propolis örneklerinin (P9 ve P10) ve ramnolipid (R) ile soforolaktonun (S) antimikrobiyal etkinliği

6.4. Propolis ve Biyosürfektanların Minimum İnhibitor ve Minumum Bakterisidal Konsantrasyonlarının Tespiti

Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen standart ve klinik izolatlara karşı tespit edilen MİK ve MBK değerleri tablo 5'te görülmektedir. MİK ve MBK değerlerinin suşlara ve örneklere göre değişkenlik gösterdiği, propolis örneklerinin herbirinin farklı sonuçlar verdiği görülmektedir.

Propolis örnekleri için MİK değerleri 0,16->166,66 mg/mL aralığında, MBK değerleri ise 0,32->166,66 mg/mL aralığında değişmektedir.

Ramnolipid için, MİK değerleri 5,2-20,83 mg/mL aralığında, MBK değerleri ise 10.4->166,66 mg/mL aralığında soforolakton için ise MİK değerleri 1,04-4.16 mg/mL aralğında, MBK değerleri ise 2.08->33,33 mg/mL aralığında değişmektedir.

Antimikrobiyal aktivite ile ilgili sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, hem propolis örneklerinde hemde biyosürfektanlarda özellikle Gram pozitif olan suşlara karşı antimikrobiyal aktivitenin daha iyi olduğu ve elde edilen MİK ve MBK değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 5. Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen standart ve klinik izolatlara karşı MİK ve MBK değerleri

Örnek	MİK (mg/mL)/MBK (mg/mL)												
	Pa. ATCC 27853	**Pa PAO1**	**Pa Pa 10**	**Ab ATCC 19606**	**Ab Ab 10**	**Ec ATCC 25922**	**Ec Ec 20**	**Sa ATCC 43300**	**Sa MR 20**	**Sa ATCC 29213**	**Sa MS 20**	**Ef ATCC 29212**	**Ef Ef 20**
P 1	83,33/83,33	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	10,41/83,33	10,41/166,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	10,41/41,66	>166,66/ >166,66	10,41/41,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66
P 2	5,20/166,66	20,83/166,66	>166,66/ >166,66	0,65/20,83	0,65/41,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	1,30/20,83	0,16/0,32	0,16/0,16	0,16/0,32	1,30/10,41	0,16/20,83
P 3	41,66/41,66	20,83/83,33	>166,66/ >166,66	0,65/20,83	0,65/20,83	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	1,30/20,83	0,16/0,65	0,16/10,41	0,16/0,65	2,60/20,83	0,16/20,83
P 4	20,83/41,66	41,66/166,66	>166,66/ >166,66	1,30/20,83	2,60/41,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	1,30/2,60	0,16/0,65	0,16/0,16	0,16/2,60	2,60/41,66	0,16/1,30
P 5	41,66 /83,33	41,66/166,66	>166,66/ >166,66	41,66/83,33	41,66/166,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	41,66/83,33	10,41/41,66	10,41/41,66	5,20/20,83	20,83/83,33	>166,66/ >166,66
P 6	10,41/83,33	41,66/166,66	>166,66/ >166,66	5,20/5,20	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	0,32/1,30	0,16/1,30	0,32/0,65	0,16/1,30	1,30/2,60	>166,66/ >166,66
P 7	10,41/41,66	20,83/83,33	>166,66/ >166,66	1,30/2,60	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	0,32/0,65	0,32/1,30	0,16/0,32	0,16/0,65	2,60/10,41	>166,66/ >166,66
P 8	20,83/83,33	20,83/166,66	>166,66/ >166,66	20,83/41,66	10,41/41,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	0,32/1,30	0,16/0,65	0,65/1,30	0,16/0,65	2,60/10,41	>166,66/ >166,66
P 9	5,20/166,66	20,83/166,66	>166,66/ >166,66	1,30/2,60	0,65/2,60	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	1,30/10,41	0,16/0,32	0,16/0,32	0,16/0,16	0,65/5,20	0,32/0,65
P 10	20,83/83,33	20,83/83,33	>166,66/ >166,66	1,30/41,66	20,83/41,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	1,30/10,41	0,16/2,60	0,16/2,60	0,16/1,30	0,65/5,20	5,20/20,83
R	20,83/41,66	10,4/20,8	>166,66/ >166,66	10,4/20,83	20,83/41,66	>166,66/ >166,66	>166,66/ >166,66	5,20/10,4	20,83/41,66	20,83/41,66	10,4 /20,83	20,8/41,66	10,4/20,83
S	4,16/8,33	4,16/8,32	>33,33/ >33,33	4,16/8,33	2,08/4,16	>33,33/ >33,33	>33,33/ >33,33	1,04/2,08	4,16/8,32	2,08/4,16	2,08/4,16	2,08/4,16	4,16/8,32

Pa: *P. aeruginosa*, Ab: *A. baumannii*, Ec: *E. coli*, Sa: *S. aureus*, Ef: *E. faecalis*, P: Propolis, R: Ramnolipid, S: Soforolakton

6.5. Propolis ve Biyosürfektanların Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkinlikleri

Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen bazı mikroorganizmaların biyofilm oluşturması üzerine olan etkinliği tablo 6-15 te görülmektedir. Propolis örnekleri ve biyosürfektanların test edilen bakterilerin biyofilm geliştirme yeteneğini farklı seviyelerde etkilediği görülmektedir.

Mikroorganizma bazında sonuçlara bakıldığında, *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün biyofilm oluşumu üzerine özellikle P1, P5, P8 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 6). Bu sonuçlar içinde özellikle ramnolipid ve soforolakton konsantrasyona bağlı olarak etkinliğini göstermiştir.

Tablo 6. *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün biyofilm oluşumu üzerine propolis örneklerinin ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	62±2,64	70±1,68	0	0
P2	0	0	0	0
P3	0	21±1,34	88±2,46	86±2,54
P4	0	21±1,75	88±3,03	86±2,80
P5	56±1,55	69±3,23	68±2,1	63±2,55
P6	0	76±2,08	86±1,96	71±2,14
P7	0	46±1,75	47±1,10	56±1,98
P8	26±2,85	35±1,60	27±1,57	24±0,98
P9	0	0	0	0
P10	0	0	47±2.89	26±3,12
R	64±1,54	62±1,86	62±1,65	36±1,09
S	55±2,76	48±1,45	26±2,71	0

P: Propolis, R: Ramnolipid, S: Soforolakton

P. aeruginosa PAO1'in biyofilm oluşumu üzerine özellikle P1, P7, P8, ve P9 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. *P. aeruginosa* PAO1'in biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	95±1,86	90±3,95	16±1,22	0
P2	10±3,22	6±0,22	4±2,01	0
P3	15±1,17	12±3,12	9±1,28	2±0,12
P4	55±2,01	50±2,75	12±2,98	26±1,54
P5	48±1,95	48±1,08	32±0,89	41±2,36
P6	30±2,66	29±3,82	32±1,88	38±2,55
P7	63±1,98	59±1,68	0	0
P8	60±2,81	52±2,52	7±2,38	4±1,02
P9	68±1,72	60±1,44	43±2,89	36±2,23
P10	25±0,97	18±1,68	10±2,1	9±1,18
R	55±2,01	52±1,92	32±1,05	0
S	51±3,01	45±1,33	0	0

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

A. baumannii ATCC 19606'nın biyofilm oluşumu üzerine özellikle P1, P3, P4, P5, P6, P9 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde oldukça güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. *A. baumannii* ATCC 19606'nın biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	71±1,37	88±1,40	100±2,88	7±0,12
P2	40±3,20	100±3,88	97±2,55	0
P3	74±2,67	100±3,47	100±3,99	5±0,14
P4	85±2,42	90±2,39	100±4,25	6±2,45
P5	100±1,03	100±2,75	100±3,12	0
P6	50±2,11	52±2,01	55±2,55	63±3,91
P7	11±2,02	37±2,50	62±2,91	71±2,22
P8	12±0,87	100±3,69	100±3,63	0
P9	100±3,86	99±3,35	100±2,88	0
P10	1±3,65	100±2,12	100±2,95	0
R	90±2,33	87±1,57	80±1,58	17±0,87
S	89±1,78	87±2,53	71±2,55	29±1,11

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

A. baumannii Ab10'un biyofilm oluşumu üzerine özellikle P6, P9 ve P10 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. *A. baumannii* Ab 10'un biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	100±4,11	0	0	0
P2	0	0	17±3,25	0
P3	0	66±3,38	70±1,88	0
P4	0	54±3,83	77±3,94	24±3,28
P5	0	100±4,81	0	0
P6	50±3,17	50±2,97	3±2,31	0
P7	33±4,25	62±2,24	99±3,93	0
P8	0	0	45±1,21	0
P9	65±4,11	57±1,54	85±2,29	19±2,89
P10	75±3,88	71±2,58	100±3,87	0
R	68±2,88	61±2,17	60±2,90	0
S	82±2,15	81±2,68	75±1,16	0

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

S. aureus ATCC 43300'un biyofilm oluşumu üzerine P1-P10 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde çok güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. *S. aureus* ATCC 43300'un biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	74±2,11	90±3,01	96±3,15	34±1,35
P2	92±0,91	98±1,54	99±2,03	88±2,66
P3	80±1,33	93±3,98	99±2,43	76±1,75
P4	96±2,06	99±2,75	99±2,80	80±2,63
P5	100±1,34	100±3,3	100±2,07	100±1,18
P6	100±2,58	99±2,13	80±1,51	0
P7	96±1,15	96±2,10	96±2,75	0
P8	88±2,25	98±3,08	79±3,97	55±2,85
P9	64±1,76	64±2,84	55±3,98	12±1,50
P10	96±2,61	100±2,10	100±1,19	62±0,41
R	87±3,21	88±1,48	90±1,8	85±1,1
S	89±2,80	85±1,09	68±1,29	0

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

S. aureus MR20'nin biyofilm oluşumu üzerine P1-P8 ve P10 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde çok güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. *S. aureus* MR 20'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	96±3,55	99±2,35	99±2,76	91±1,63
P2	71±1,22	84±3,45	69±3,63	19±1,95
P3	52±1,72	56±3,44	±421,94	42±2,97
P4	67±2,61	52±1,66	61±1,96	27±1,55
P5	100±3,22	98±1,98	69±2,22	61±1,72
P6	76±2,08	69±2,75	25±2,78	17±2,75
P7	67±2,82	96±2,36	75±3,55	66±3,60
P8	94±1,75	94±3,83	69±4,55	24±2,08
P9	7±2,68	30±1,58	28±0,91	0
P10	73±2,52	69±4,03	65±2,51	0
R	88±2,55	89±1,66	69±2,37	73±1,35
S	90±2,14	89±1,84	59±1,44	54±0,88

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

S. aureus ATCC 29213'ün biyofilm oluşumu üzerine P1-P8 ve P10 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde çok güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. *S. aureus* ATCC 29213'ün biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	96±2,09	100±1,71	100±2,60	80±2,03
P2	65±2,83	43±2,36	48±1,75	6±0,21
P3	94±1,44	96±2,35	94±2,52	56±3,68
P4	92±1,68	98±1,75	94±2,08	80±2,75
P5	61±3,55	96±3,22	76±2,63	70±1,91
P6	80±2,55	100±1,78	72±2,22	69±1,96
P7	99±2,63	98±1,76	63±3,40	32±1,43
P8	77±1,01	100±1,51	99±2,47	76±2,48
P9	49±3,19	40±2,13	37±2,30	0
P10	99±1,63	100±3,18	98±1,06	44±2,94
R	88±2,32	78±1,35	78±2,11	53±0,83
S	90±1,19	81±2,48	76±2,97	5±1,18

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

S. aureus MS20'nin biyofilm oluşumu üzerine P1, P2, P4-6, P8 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde çok güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. *S. aureus* MS20'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	**MİK / 2**	**MİK / 4**	**MİK / 8**
P1	100±4,33	99±2,37	100±3,91	98±3,62
P2	82±3,52	57±3,24	46±2,55	7±1,88
P3	32±2,88	28±3,74	29±1,78	14±2,20
P4	95±3,11	96±1,41	87±1,22	20±1,01
P5	78±5,14	97±3,79	86±3,88	76±3,74
P6	71±2,31	65±3,57	48±3,96	13±1,48
P7	35±2,61	86±4,22	64±3,63	0
P8	73±3,10	99±4,15	98±1,44	78±1,99
P9	0	0	0	0
P10	44±1,14	59±3,61	63±2,69	33±2,95
R	90±1,88	89±0,80	89±1,46	86±1,26
S	91±2,42	84±2,06	78±2,12	23±1,81

P: Propolis, R: Ramnolipid, S: Soforolakton

E. faecalis ATCC 29212'nin biyofilm oluşumu üzerine P1-P8 ve P10 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde çok güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. *E. faecalis* ATCC 29212'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	**MİK / 2**	**MİK / 4**	**MİK / 8**
P1	94±2	97±3,11	100±0,25	67±1,23
P2	94±2,11	62±2,81	50±3,01	46±1,51
P3	82±2,66	83±2,56	84±2,50	50±2,20
P4	79±3,42	58±3,55	64±2,79	0
P5	56±1,72	73±1,83	81±2,35	0
P6	100±1,88	98±2,94	73±2,96	55±2,84
P7	74±1,83	92±1,63	75±3,12	44±3,61
P8	39±3,01	97±2,22	69±4,12	99±3,99
P9	47±2,04	0	0	0
P10	61±2,41	57±1,02	50±2,29	0
R	89±1,45	90±2,24	90±1,24	84±2,59
S	91±3,12	89±1,28	50±1,15	11±2,11

P : Propolis, R: Ramnolipid, S : Soforolakton

E. faecalis Ef20'nin biyofilm oluşumu üzerine P1-P9 ve P10 ile ramnolipid ve soforolaktonun %50 nin üzerinde çok güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. *E. faecalis* Ef20'nin biyofilm oluşumu üzerine propolis ve biyosürfektanların etkinliği

Örnek	Biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%)			
	Konsantrasyon			
	MİK	MİK / 2	MİK / 4	MİK / 8
P1	98±1,52	98±2,14	100±2,55	89±2,79
P2	95±2,11	99±3,50	58±3,40	0
P3	92±3	48±3,87	36±2,86	1±1,035
P4	50±3,61	30±2,60	20±2,22	13±1,96
P5	96±4,96	100±3,76	98±3,40	85±3,51
P6	94±3,95	74±3,37	67±1,49	30±3,32
P7	87±2,59	87±2,67	0	0
P8	31±4,10	38±2,42	42±4,39	0
P9	100±2,39	100±1,58	100±5,01	22±1,91
P10	88±3,41	88±3,11	87±3,50	71±1,45
R	88±1,23	88±1,17	87±1,04	71±2,41
S	92±1,45	48±1,99	50±1,54	0

P: Propolis, R: Ramnolipid, S: Soforolakton

6.6. Propolis ve Biyosürfektanların Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun Tespiti

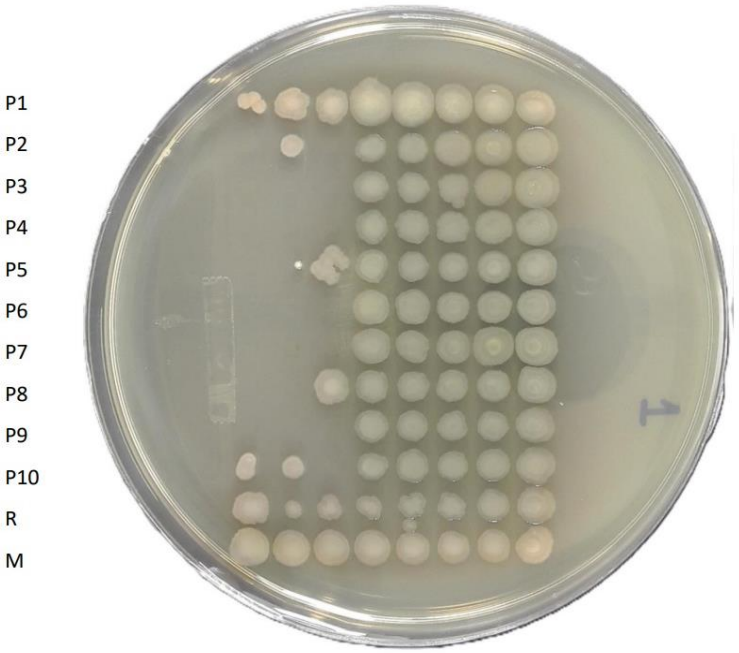
Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen standart ve klinik izolatlara karşı tespit edilen MBEK değerleri tablo 16'da görülmektedir. MBEK değerlerinin oldukça

yüksek değerler ya da çalışılan konsantrasyonların üzerindeki konsantrasyonların gerektiği görülmektedir (Tablo 16, Şekil 9).

Tablo 16. Propolis örneklerinin ve biyosürfektanların test edilen standart suş ve klinik izolatlara karşı MBEK değerleri

Örnek	MBEK (mg/mL)									
	Pa. ATCC 27853	**Pa PAO1**	**Ab ATCC 19606**	**Ab Ab 10**	**Sa ATCC 43300**	**Sa MR 20**	**Sa ATCC 29213**	**Sa MS 20**	**Ef ATCC 29212**	**Ef Ef 20**
P1	166,66	>166,66	166,66	>166,66	>166,66	166,66	>166,66	>166,66	166,66	>166,66
P2	>166,66	166,66	>166,66	41,66	41,66	41,66	83,33	41,66	41,66	41,66
P3	166,66	166,66	83,33	41,66	166,66	41,66	166,66	41,66	83,33	41,66
P4	83,33	>166,66	83,33	83,33	41,66	83,33	5,2	5,2	83,33	41,66
P5	>166,66	>166,66	>166,66	>166,66	>166,66	166,66	>166,66	166,66	>166,66	41,66
P6	>166,66	>166,66	41,66	>166,66	166,66	10,41	41,66	41,66	41,66	>166,66
P7	166,66	>166,66	166,66	>166,66	20,83	41,66	41,66	41,66	166,66	>166,66
P8	166,66	>166,66	>166,66	>166,66	41,66	83,33	41,66	41,66	41,66	>166,66
P9	>166,66	>166,66	41,66	10,41	41,66	41,66	41,66	41,66	83,33	41,66
P10	>166,66	>166,66	166,66	>166,66	41,66	41,66	83,33	5,2	41,66	83,33
R	>166,66	>166,66	166,66	>166,66	>166,66	>166,66	>166,66	166,66	>166,66	>166,66
S	>33,33	>33,33	>33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	>33,33	>33,33

Pa: *P. aeruginosa*, Ab: *A. baumannii*, Ec: *E. coli*, Sa: *S. aureus*, Ef: *E. faecalis*, P: Propolis, R: Ramnolipid, S: Soforolakton



Şekil 9. MBEK değerinin tespit edilmesinde kullanılan ve *P. aeruginosa* PAO1'ya ait ekim sonuçlarına ait kültür görseli (P: Propolis, R: Ramnolipid, M: Meropenem)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antibiyotik direnci, antibiyotiklerin keşfinden itibaren başlayan süreçte günümüzde daha ciddi boyutlara ulaşmıştır. Günümüzde mevcut antibiyotikler ile tedavi edilemeyecek olan mikroorganizmalar karşımıza enfeksiyon etkeni olarak çıkmakta ve Dünya çapında heryıl milyonlarca insan antibiyotik direnci nedeni ile hayatını kaybetmektedir. 2019 yılında tahminen 4,95 milyon kişi antibiyotik direnci nedeni ile hayatını kaybetmiştir. İlerleyen yıllarda bu sayının hızla artarak 2050 yılında, yılda 10 milyon insanın antibiyotik direnci nedeni ile hayatını kaybedebileceği tahmin edilmektedir. Bu sorunu kontrol edebilmek için, tarım ve hayvancılık alanlarında antibiyotik tüketiminin azaltılması, mevcut antibiyotiklerin doğru dozda, doğru süre boyunca ve doğru şekilde akılcı olarak kullanılmasının desteklenmesi ve yeni antimikrobiyal etkili bileşiklerin tespit edilmesi/sentezlenmesi gerekmektedir. Günümüzde yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfedilmesi amacı ile bitkisel ve diğer doğal bileşikler yaygın olarak çalışılmaktadır. Bu bileşiklerin bazılarının çeşitli mikrobiyolojik etkinliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (WHO, 2024; Nasırlı, 2020; Thakur ve ark., 2021; Gomes, ve ark. 2024).

Mikroorganizmalar virulans faktörü adı verilen özellikleri ile enfeksiyon hastalıklarının oluşumuna neden olmaktadır. Virulans faktörlerinin durudurulması/azaltılması enfeksiyon gelişimini azaltabilmektedir. Biyofilm mikroorganizmaların sahip olduğu virulans faktörlerinin en önemlilerinden birisidir. Biyofilm üretimi, mikroorganizmaları dış toksik faktörlere karşı koruyan ve onları antibiyotiklere karşı dirençli hale getirebilen doğal bir olaydır. Biyofilmlerde bulunan ekstraselüler polimerik matriks, konak savunma sistemlerine, antibiyotiklere ve diğer ilaçlara karşı duyarlılığı azaltır ve böylece kronik enfeksiyonlarda bakteriyel persistansa katkıda bulunur. Tedavi amacı için kullanılan antimikrobiyal ilaçların biyofilm içine yeterli dozda ulaşamaması nedeni ile biyofilm içinde bulunan mikroorganizmalar etkili dozun altındaki konsantrasyonlardaki antimikrobiyallere maruz kalmakta, bu durumda direnç gelişimine neden olmaktadır. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların öldürülebilmesi için normal tedavi edici dozun genel olarak 500 katı kadar yüksek konsantrasyonların kullanılması gerekektedir. İlaç toksisitesi nedeni ile bu durum mümkün olamıyacağı için tedavide ciddi güçlükler

yaşanmaktadır. Olgunlaşmış biyofilm yapısının ortadan kaldırılması oldukça zordur, bu nedenle biyofilm kronik enfeksiyonların gelişimine ve enfeksiyonun diğer vücut kısımlarına da yayılmasına neden olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda biyosürfektanların geleneksel biyofilm inhibatörlerinden daha etkin olduğunu gösteren çalışmalar bunmaktadır (Sauer ve ark., 2022; Ohadi ve ark., 2020).

Biyosürfektanlar başlıca mikkroorganizmalar tarafından üretilmekte olup geniş bir uygulama alanına sahiptir. Çoğunlukla hayvancılık, tarım, gıda ve ilaç endüstrilerinde bir bileşen olarak kullanılmaktadırlar. Günümüzde biyosürfektanlar, sentetik yüzey aktif maddelere göre daha az toksik ve çevre dostu olmaları ve belirli alanlarda daha yüksek aktiviteye sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir.

Biyosürfektanlar çoğunlukla mikroorganizmalar tarafından üretilen ve farklı amaçlar için kullanılabilen bileşiklerdir. Biyosürfektanların antibakteriyel, antifungal, antiviral, antibiyofilm, immünomodülatör ve antikanser özellikleri başta olmak üzere birçok aktivitesi vardır. Bunlara ek olarak, birçok çalışmada antimikrobiyal etkiye sahip bazı bileşiklerle kombine edildiğinde antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerinin arttırdığı tespit edilmiştir (de Souza Araújo ve ark., 2024; Kumar ve ark, 2021; Thakur ve ark., 2021; Davarey ve ark., 2021; Joshi-Navare ve ark., 2013). Bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda, günümüzde yaygın bir sağlık sorunu olan antimikrobiyal direncin önlenmesi veya yavaşlatılması için insanda hastalık yapabilen başlıca patojenlere karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğin belirlenmesi için glikolipid grubu biyosürfektan olan ramnolipid ve soforolipid grubu bir biyosürfektan olan soforolaktonun bazı patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm özellikleri araştırılmıştır.

Ramnolipid bazı *P. aeruginosa* türleri tarafından üretilmekte olup en çok çalışılan biyosürfektandır. Ramnolipidlerin ayrıca apoptozu indüklediği ve böylece kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebildiği, antimikrobiyal özellikleriyle ilgili olarak yüzey hidrofobisitesini düşürdüğü ve sitoplazmik zara zarar verdiği bilinmektedir. Ramnolipidler ayrıca in vivo ilaç iletimi için nanopartiküllerin sentezinde de yer alırlar (Thakur ve ark., 2021).

Soforolakton bir soforolipittir. Soforolipidler, Starmerella, Candida ve Pseudohyphozyma gibi çeşitli maya türleri tarafından üretilir ve yapısında glikozidik

bağlantılı bir uzun zincirli hidroksi yağ asidi ile disakkarit soforoz bulunur. Soforolipidlerin ciltte tahrişe neden olmadığı, alerjik reaksiyonları tetiklemediği bilinmektedir bu özelliklerinden dolayı insanda kullanıma uygun olarak görülmektedir. Antibiyofilm ajan olarak soforolipidler, hücreler arası yapışmayı bozarak biyofilm gelişimini inhibe ettiği bilinmektedir. Literatürde antibiyotiklerle sinerjik etkileşim gösterebildiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Vieira ve ark., 2021; Pal ve ark., 2023).

Propolis arılar tarafından oluşturulan, kovanın mikrobiyal açıdan korunmasını, kovan sıcaklığının ve neminin stabilitesininin sağlanmasına yardımcı olan doğal bir maddedir. Propolis antimikrobiyal, antibiyofilm, antikanser, antiinflamatuar, antistres gibi çalışma alanlarında literatürde araştırma konusu olmaktadır. Literatürde propolisin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkili bir madde olduğu ve her iki bakteri grubuna karşı da benzer etkinlik gösterdiği belirtilmektedir. Propolisin etkinliğinin yapısında bulunan ikincil metabolit bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak propolisin yapısında bulunan bu bileşiklerin çeşidi ve miktarı çevredeki bitki örtüsüne, toplama mevsimine, toplayıcı arıların türüne göre değişiklik göstermektedir. Bu durumda propolisin etkinliğini değiştirebilmektedir (Nalbantsoy, 2022; Alcivar-Saldana ve ark., 2024; Gomes ve ark., 2024).

Çalışmamızda başlıca insan patojenleri olan ve direnç gelişiminin yaygın ve kolay olduğu mikroorganizmalar tercih edilmiştir. Bu amaçla *P. aeruginosa, A. baumannii, E. coli, S. aureus* ve *E. faecalis* suşları kullanılmıştır.

Patojen mikroorganizmalarda biyosürfektan üretimi hakkında veri olmaması nedeni ile patojen bakterilerde biyosürfektan üretiminin olup olmadığını test etmek için biyosürfektan üretiminin yaygın olarak görüldüğü *P. aeruginosa* türünün klinik izolatları tercih edilmiştir. Daha sonra klinik izolatların biyofilm geliştirme kapasiteleri belirlenerek, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere her bir bakteri türünden en yüksek biyofilm oluşturma yeteneğine sahip birer bakteri seçilmiştir. Bu mikroorganizmaların standart ve klinik izolatları üzerine, 10 farklı propolis örneğinin, biyosürfektan olarak ramnolipid ve soforolaktonun antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliği araştırılmıştır. Soforolakton hakkında literatürde veri bulunmamaktadır. Bu nedenle soforolaktona ait

verilerin tarışılması için dahil olduğu soforolipid grubu biyosürfektan verileri ile yapılmıştır.

P. aeruginosa ATCC 10145 ve 10 klinik *P. aeruginosa* suşu ile gerçekleştiren biyosürfektan oluşumunun tespiti çalışmamızda klinik *P. aeruginosa* izolatlarında biyosürfektan oluşumu tespit edilememiştir. Literatür taramasında da klinik mikroorganizmalardan biyosürfektan üretimine ait veriye rastlanmamıştır.

Propolis örneklerinin antimikrobiyal aktivitesinin tespitinde elde edilen sonuçlara göre (Tablo 4 ve 5) oluk difüzyon yönteminde antimikrobiyal aktivitenin Gram pozitif bakteriler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Bunun yanında P1, P4, P6, P7 ve P10 propolis örneklerinin *P. aeruginosa, A. baumannii* üzerine antimikrobiyal etkili olabildiği görülmektedir (Tablo 4). MİK ve MBK değerlerine bakıldığında ise MİK ve MBK değerlerinin çok değişkenlik gösterdiği ve özellikle Gram pozitif bakterilere karşı MİK ve MBK konsantrasyonlarının daha düşük olduğu görülmektedir. Çalışmamızda propolis örnekleri için MİK değerleri 0,16->166,66 mg/mL aralığında, MBK değerleri ise 0,32->166,66 mg/mL aralığında değişmektedir (Tablo 5).

Propolisin antimikrobiyal etkinliği ile ilgili araştırmalarda genel olarak Gram pozitif bakterilere karşı etkinliğin, çalışmamızda olduğu gibi daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Przybylek ve ark., 2019). Bu durumun, Gram negatif bakterilerin dış membranının türe özgü yapısı ve propolisin aktif bileşenlerini parçalayan hidrolitik enzimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Przybylek ve ark., 2019; Sforcin ve ark., 2016). Antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus* spp., *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium difficile*, *E. coli*, Salmonella spp., *Klebsiella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis* ve *Aspergillus niger* gibi bir çok mikroorganizma üzerine propolisin antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Przybylek ve ark., 2019; Boyonova ve ark., 2005, Afata ve ark., 2023).

Porpolis ile ilgili olarak çalışmamıza benzer ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında, Alıç (2015), 7 propolis örneği ile yapmış olduğu çalışmada 100mg/mL-12,5 mg/mL lik konsatrasyon aralığında oluk difüzyon yöntemi ile *C. albicans* ATCC 10239, *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* CNCTC 8/77, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *S. typhimurium* ATCC 14028' e karşı antimikrobiyal etkiliğe sahip olduğunu ve en yüksek *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı antimikrobiyal aktivitenin bulunmadığını bildirmişlerdir. Nalbantsoy ve diğerlerinin (2022) 7 propolis örneği ile gerçekleştirdiği çalışmadan elde ettikleri en düşük MİK değerinin ise MSSA için 31,2 µg/mL, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için 62,5 µg/mL, *E. faecalis* ATCC 29212 için 31,2 µg/mL, *E. coli* O157:H7 için 62,5 µg/mL, *S. epidermidis* ATCC 12228 için 31,2 5 µg/mL, *E. faecium* DSM 13590 için 31,2 µg/mL, *Salmonella Typhimurium* CCM 5445 için 62,5 µg/mL, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 için 31,2 µg/mL, *Candida tropicalis* RSKK 2412 için 31,2 µg/mL ve *Candida albicans* ATCC 10231 için 62,5 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Gomes ve diğerleri (2024), 21 propolis örneği ile yaptığı çalışmadan elde ettiği en düşük MİK-MBK değerlerinin sırası ile MSSA suşu için 0,001-0,20 mg/mL, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için 0,08-0,20 mg/mL, *E. coli* ATCC 25922 için 0,05-0,20 mg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. Pimenta ve diğerleri (2015) kahverengi propolisin *E. faecalis* ATCC 29212 için MİK değerini 1000 mg/mL olarak tespit etmişlerdir. Moncla ve diğerleri (2012) propolisin MİK-MBK değerlerini MSSA için 400-<50 µg/mL, *E. coli* ATCC 25922 için >1600->1600 µg/mL ve *E. faecalis* ATCC 29212 için 1600-1600 µg/mL olarak bildirmiştir. Mecatti ve diğerleri (2023) Brezilya yeşil propolisi ile yapmış olduğu çalışmada MBK değerlerini *A. baumannii* ATCC 19606 suşunda 10 mg/mL, *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşunda 1,2 mg/mL olarak tespit etmişlerdir. Çalışma bulgularına bakıldığında çalışmamızda olduğu gibi sonuçların değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Bu değişkenliğin propolis bileşiminde yer alan maddelerin farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ramnolipid ve soforolakton ile ilgili sonuçlar incelendiğinde antimikrobiyal etkinliğin Gram pozitif bakterilere karşı oldukça yüksek olduğu ve neredeyse tüm bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlik tespit edilmiştir. Biyosürfektanların Gram negatif bakterilere karşı genellikle antimikrobiyal aktivite göstermediği veya bu aktivitenin daha az olduğu diğer araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Habibah ve ark, 2024; de Freitas ve ark., 2019; Diaz De Rienzo ve ark., 2016b;

Totsingan ve ark., 2021). Bu sonuçlar benzer çalışmalar ile uyumludur. Ramnolipidin *P. aeruginosa* PAO1 ve *A. baumannii* ATCC 19606 üzerine soforolipidin ise Klinik *A. baumannii* olan Ab10 izolatı üzerine antimikrobiyal etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Ramnolipid için, MİK değerleri 5,2-20,83 mg/mL aralığında, MBK değerleri ise 10.4->166,66 mg/mL aralığında soforolakton için ise MİK değerleri 1,04-4,16 mg/mL aralğında, MBK değerleri ise 2,08->33,33 mg/mL aralığında değişmektedir (Tablo 5). Ayrıca, sonuçlarımız soforolaktonun MİK ve MBK değerlerinin ramnolipidden daha düşük olduğunu göstermiştir (Tablo 5). Bu durum soforolaktonun antimikrobiyal etkinliğinin ramnolipide göre daha güçlü olabildiğini göstermektedir.

Oluk difüzyon yöntemi antimikrobiyal etkinliğin tespitinde propolis örneklerinin ve biyosürfektanların Gram negatif mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarına karşı antimikrobiyal etkili olduğu bulunurken, Gram negatif mikroorganizmaların birçoğunda propolis örneklerinin ve biyosürfektanların MİK/MBK değerlerinin tespitinde, antimikrobiyal altivitenin gözlendiği ve MİK/MBK değerlerinin tespit edilebildiği görülmüştür. Bu durumun örneğin uygulandığı ortamın farkından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sıvı besiyeri ortamında örneklerin etkinliğinin artabileceğini göstermektedir (Tablo 4 ve 5).

Biyosürfektanların, antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili olarak bazı patojen mikroorganizmalara karşı araştırmalar yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmaları içeren çalışmalarda antimikrobiyal aktivite açısından ramnolipidin *A. baumannii* (Firdose ve ark., 2024; Firdose ve ark., 2023), *S. aureus* ATCC 9144 (Díaz De Rienzo ve ark., 2016a; Díaz De Rienzo ve ark., 2015), *S. aureus* ATCC6538 (Habibah ve ark, 2024; Firdose ve ark., 2023; Saadati ve ark., 2022), *P. aeruginosa* (Firdose ve ark., 2023), *Enterobacter* spp. (Firdose ve ark., 2023), soforolipidin ise *S. aureus* ATCC 9144 (Díaz De Rienzo ve ark, 2016b), *S. aureus* (Shikha ve ark., 2020), *P. aeruginosa* PAO1 (Díaz De Rienzo ve ark, 2016b, Díaz De Rienzo ve ark., 2015), *E. coli* NCTC 10418 (Díaz De Rienzo ve ark., 2015) ve *E. coli*'ye (Gaur ve ark., 2019) karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Mevcut çalışmalara bakıldığında, özellikle çalışmamızda kullanılan bakteriler için ramnolipidler ve soforolipidler ile yapılan çalışmaların az olduğu ve çoğunlukla klinik mikroorganizmaların araştırılmadığı görülmektedir. Burada yer alan çalışmalarda kullanılan biyosürfektanların bir kısmı

araştırmacılar tarafından üretilmiş olup kullanılan biyosürfektanlar ve antimikrobiyal aktivitenin tespitinde kullanılan yöntemlerdeki farklılıklar nedeniyle, elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçlarında farklılıklar bulunmaktadır (Firdose ve ark., 2023; Díaz De Rienzo ve ark., 2015; Saadati ve ark., 2022).

Biyosürfektanların antimikrobiyal etkinliği hakkında difüzyon yöntemleri ile *P. aeruginosa* UKMP14T'den ekstrakte edilen bir ramnolipidin (Firdose ve ark., 2024) *S. aureus, A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'ya karşı, başka bir çalışmada ise soforolipidin ise *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkili olduğu bulunmuştur (Shikha ve ark., 2020). Diğer çalışmalarda da farklı yöntemler kullanılarak antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir (Firdose ve ark., 2024; Habibah ve ark., 2024; Díaz De Rienzo ve ark., 2015).

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda, elde edilen MİK ve MBK değerlerine bakıldığında ramnolipidin MSSA'a karşı MİK değerinin 350 µg/mL, *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MİK değerinin 230 µg/mL, *P. aeruginosa*'ya karşı MİK değerinin 250 µg/mL, *E. coli*'ye karşı MİK değerinin 20 µg/mL olduğu (Yılmaz, 2001), *S. aureus* ATCC 9144' e karşı MİK değerinin %0,5 (v/v) (Díaz De Rienzo ve ark, 2016b), *S. aureus* ATCC 6538 e karşı MİK değerinin 19 µg/mL olduğu (Habibah ve ark., 2024), *P. aeruginosa* UKMP14T'den ekstrakte edilen bir ramnolipidin, *S. aureus, K. pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa* için MİK ve MBK değerlerinin sırası ile 7,81-62,5 µg mL/ml ve 31,25-1000 µg /ml olduğu (Fridose ve ark., 2024), ramnolipid ve soforolipidin *S. aureus* için MİK değerinin 50 µg/mL olduğu (Bettencourt ve ark., 2021), sohorolipidin *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* NCTC 10418, *S. aureus* ATCC 9144 için MİK değerinin %1 (v/v) olduğu (Díaz De Rienzo ve ark., 2015) tespit edilmiştir. Çalımamızda elde edilen verilere bakıldığında (Tablo 5) MİK ve MBK değerlerinin literatürde yer alan bazı çalışmalarla benzer olduğunu ve bir kısmı ile çok farklılıklar içerdiği görülmektedir. Sonuçlardaki farklılıklar ramlolipid, soforolipid çeşidi ve kullanılan mikroorganizmaların farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Propolis örnekleri, ramnolipid ve soforolaktonun antibiyofilm etkinliğinin tespiti için biyofilm oluşumu inhibisyonu ve oluşmuş biyofilm üzerine antimiktobiyal aktiviteyi temsil eden minmum biyofilm eradkikasyon konsantrasyonu (MBEK) çalışmaları yapılmıştır. Propolis örneklerinin, ramnolipid ve soforolaktonun bakterilerin biyofilm gelişimi üzerine olan etkinliği ve oluşmuş biyofilm içindeki mikroorganizmaların yok

edilmesi üzerine olan etkinliğine bakıldığında, propolis örneklerinin, ramnolipid ve soforlolaktonun biyofilm gelişimini genel olarak güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmektedir (Tablo 6-15). Biyofilm gelişiminin inhibisyonu çalışmalarında özellikle propolis örneklerinin bazılarında MİK konsantrasyonlarında biyofilm gelişiminin inhibisyonunun olmadığı ve ilginç olarak daha düşük konsantrasyonlarda ise biyofilm gelişiminin inhibisyonunun var olduğu görülmektedir (Tablo 6-15). Bu durumun hazırlanan poropolis ekstraktlarının partiküllü yapıda olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Benzer şekilde Nasırlı (2020), çalışmasında 4 farklı çözücüde çalıştığı 2 propolis örneğinin biyofilm inhibisyonu yüzdelerine baktığımızda etil asetat-propolis 1 örneğinin 400 µg/mL konsantrasyonu %64,66 inhibisyon oluştururken 600 µg/mL konsantrayonda %59,88 inhibisyon gözlenmiştir. Yine aynı şekilde koloroform-propolis 2 örneğinde de 150 µg/mL lik konsantrasyonun 175 µg/mL konsantrasyondan daha yüksek inhibisyon etkisi olduğu belirtilmiştir. Bu durum çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Oluşmuş biyofilm üzerine tüm örnekler için genel olarak yüksek konsantrasyonların gerekli olduğu çoğunda ise çalışmada kullanılan konsantrasyonların yetersiz kaldığı görülmektedir. Propolis örneklerinden bazıları özellikle Gram pozitif bakteriler üzerine 5,2-41,66 mg/ml konsantrasyonlarda etkinlik göstermiştir (Tablo 16). Oluşmuş biyofilm içindeki mikroorganizmaların yok edilebilmesi için antimikrobiyal moleküllerin çok yüksek konsatrasyonlarının gerekli olduğu bilinen bir gerçektir. Çalışma bulgularımızda da bu durum görülmüştür.

Propolis örnekleri ve ramnolipid ile soforolaktonun mikroorganizmaların biyofilm gelişimi ve oluşmuş biyofilm içindeki mikroorganizmaların öldürme yeteneği hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Propolisin mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine olan etkinliğinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında, Ceylan ve ark. (2020), 7 propolis örneğinin antibiyofilm etkinlğini araştırdığı çalışmasında, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *S. typhimurium* bakterilerinin biyofilm gelişimini genel olarak konsantrasyona bağlı olarak %82'ye varan oranlarda inhibe edebildiğini göstermiştir (Alıç, 2015). Doğanlı (2016), 3 propolis örneği ile yapmış olduğu çalışmada 2-0,1 mg/mL 'lik konsantrasyonda oluşmuş biyofilm inhibisyonu % lerinin MSSA suşunda %0-49, *E. faecalis* ATCC 19433 suşunda ise %0-71 aralığında olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalarda da görüldüğü gibi çalışmamızda

olduğu gibi propolis biyofilm gelişiminin inhibisyonu açısından oldukça aktif olarak görünmektedir.

Çalışmamızda ramnolipid ve soforolakton'un 1-1/8 MİK konsantrasyon aralığında bakterilerin biyofilm gelişimi ve oluşmuş biyofilm içindeki mikroorganizmaların öldürme etkinliği her bir mikroorganizma için araştırılmıştır. Sonuçlar ramnolipid ve soforolaktonun tüm mikroorganizmaların biyofilm gelişimini özellikle MİK ve yakın değerlerde değişen oranlarda çok güçlü bir şekilde inhibe edebildiğini göstermiştir (Tablo 6-15). Konsantrasyon arttıkça biyofilm inhibisyon oranının da arttığı görülmüştür. Bu da ramnolipid ve soforolaktonun biyofilm gelişimi üzerindeki etkinliğininin güçlü olduğunu göstermektedir. Ramnolipidin farklı konsantrasyonlardaki biyofilm inhibisyon etkinliği %32-90 iken, soforolaktonunki %5-92'dir (Tablo 6-15). Ramnolipid ve soforolaktonun olgun biyofilm üzerindeki etkisi incelendiğinde, biyofilmdeki mikroorganizmaların yok edilmesi için genellikle ramnolipid ve soforolaktonun maksimum konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonların gerekli olduğu görülmüştür (Tablo 16). Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) değerlerinin, ramnolipid için *S. aureus* MS20 ve *A. baumannii* ATCC 19606'a karşı 166,66 mg/ml konsatrasyonda, soforolakton için *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MR20, *S. aureus* ATCC 43300 ve *A. baumannii* Ab10'a karşı 33,13 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Bu açıdan, soforolaktonun daha etkin olduğu görülmektedir (Tablo 16). Genel olarak, sonuçlar ramnolipid ve soforolaktonun biyofilm gelişiminin engellenmesi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğunu, olgun biyofilmlerdeki mikroorganizmaların yok edilmesi için ise çok yüksek konsantrasyonların gerekli olduğunu göstermektedir.

Ramnolipidler ve soforolipidler üzerine yapılan çalışmalar, ramnolipidlerin ve soforolipidlerin tek başına biyofilm gelişimini inhibe ettiğini ve kombinasyon halinde bazı maddelerin biyofilm gelişimini inhibe etme yeteneğini artırabileceğini göstermiştir (Firdose ve ark., 2024; Chang ve ark., 2023; Díaz De Rienzo ve ark., 2015; Saadati ve ark., 2022; Shikha ve ark., 2020; Sidrim ve ark., 2020; Yamasaki ve ark., 2020; Ceresa ve ark., 2020; Haque ve ark., 2016; Nguyen ve ark., 2020; Diaz De Rienzo ve ark., 2016b; Lydon ve ark., 2017). Özellikle soforolipidlerin antimikrobiyal ve antibiyofilm ajanları olarak yüksek potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Díaz De Rienzo ve ark., 2015).

Çalışmamızda kullanılan bakterilerle biyofilm gelişimi ve olgun biyofilmlerdeki mikroorganizmaların yok edilmesi üzerine yapılan çalışmalarda ramnolipler ve soforolipidler kullanılmıştır, *P. aeruginosa* UKMP14T'den elde edilen ramnolipid 1000 µg/ml konsantrasyonda *A. baumannii*'ye karşı antibiyofilm aktivitesi göstermiştir (Firdose ve ark., 2024); kaprilik asit ile birlikte biyosürfektanların etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, özellikle soforolipidin (%1) *P. aeruginosa* PAO1 ve *E. coli* NCTC 10418'nin yüzeye yapışmasını ve biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (Díaz De Rienzo ve ark, 2016b); *P. aeruginosa* MA01'den izole edilen ramnolipid 60mg/ml konsantrasyonda *S. aureus* ATCC 6538'in biyofilm gelişimini inhibe etmiş ve bazı biyofilm oluşumu ve quorum-sensing genlerinin aktivitesini azaltmıştır (Saadati ve ark., 2022); soforolipidin 50-100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda *S. aureus*'un biyofilm oluşumu üzerinde inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir (Shikha ve ark., 2020). Bazı çalışmalarda ise soforolipid karışımlarının biyofilm üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Farklı soforolipidlerin karışımının *P. aeruginosa* PAO1'in gelişimi üzerinde bir etkisi olmadığı, bu karışımın biyofilm üzerinde yıkıcı bir etkisi olduğu ve biyofilmdeki mikroorganizma sayısını azalttığı bulunmuştur (Nguyen ve ark., 2020). Bazı araştırmacılar biyosürfektan karışımlarının iki bakterinin birlikte oluşturduğu biyofilmler üzerindeki etkinliğini incelemişlerdir. Örneğin, *P. aeruginosa* ATCC 15442 ve *S. aureus* ATCC 9144 tarafından oluşturulan biyofilm üzerinde soforolipid (%0.01) ve ramnolipid (%0.04) kombinasyonu biyofilm yıkımını ve biyofilmdeki mikroorganizma sayısını inhibe etmiştir. Ayrıca araştırmacılar Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere göre soforolipidlere daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Diaz De Rienzo ve ark., 2016b). Önceki çalışmalar incelendiğinde, çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antibiyofilm aktivitesi gözlenmiştir. Biyofilm üzerindeki inhibitör etkinin elde edildiği konsantrasyonlar göz önüne alındığında, çalışmamızda biyofilm üzerindeki etkinliği belirlemek için MİK'e dayalı bir sistem kullanılmıştır. Çalışmamızda elde edilen etkili dozların diğer çalışmalardaki dozların üzerinde konsantrasyonlar olduğu görülmektedir (Firdose ve ark., 2024; Díaz De Rienzo ve ark, 2016b; Saadati ve ark., 2022; Shikha ve ark., 2020; Nguyen ve ark., 2020; Diaz De Rienzo ve ark., 2016b). Bunun kullanılan biyosürfektanlar veya mikroorganizmalardaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. Literatürde *E. faecalis*'in standart ve klinik suşlarına yönelik doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu mikroorganizma ile yapılan bir çalışmada, soforolipidin kanamisin ve sefotaksim ile birlikte kullanıldığında *E. faecalis* ATCC 29212 ve *P. aeruginosa* PAO1'e karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi açısından sinerjistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Lydon ve ark., 2017). Çalışmamızda, ramnolipidin bu mikroorganizmalar için MİK-1/8 MİK konsantrasyon aralığında %71-90 gibi yüksek bir biyofilm inhibisyon oranı gösterdiği, soforolaktonun ise MİK-1/2 MİK konsantrasyon aralığında %48-92 gibi yüksek bir biyofilm inhibisyon oranı gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 6-15).

Sonuç olarak, çalışmamızda klinik *P. aeruginosa* izolatlarında, kullandığımız yönteme göre biysürfektan üretiminin bulunmadığını, propolis örneklerinin, ramnolipid ve soforolaktonun farklı derecelerde antibakteriyal ve güçlü antibiyofilm etkinliğine sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kullanılan örneklerin oluşmuş biyofilm içindeki bakterilerin yok edilmesi konusunda etkin olmadıkları ve çok yüksek dozların gerekli olduğu tespit edilmiştir. Propolisin ve biyosürfektanların antimikrobiyal etkinliği ve antibiyofilm etkinliğinin güçlü olduğu ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için yeni yaklaşımların oluşturulması açısından potansiyel taşıdığı görülmüştür.

8. KAYNAKLAR

Afata, T. N., & Dekebo, A. (2023). Chemical composition and antimicrobial effect of western Ethiopian propolis. *Chemistry & biodiversity*, *20*(2), e202200922. https://doi.org/10. 1002/cbdv.202200922

Afeke, I., Adu-Amankwaah, J., Nyarko, M., Bushi, A., Ablordey, A. S., Duah, P. A., I Wowui, P., & Orish, V. N. (2022). *Acinetobacterbaumannii*-induced infective endocarditis: new insights into pathophysiology and antibiotic resistance mechanisms. *Future microbiology*, *17*, 1335–1344. https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0279

Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J. P., & Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, *13*(10), 677. https://doi.org/10.3390 /toxins13100677

Aktaş N. (2010). *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm oluşumu ve panton-valentine lökosidin varlığının araştırılması [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Marmara Üniversitesi.

Alcivar-Saldana J.J, Rodriguez-Monroy M.A., Carrillo-Miranda L., & Canales-Martinez M.M. (2024). Botanical origin and biological properties of honey and propolis from cuautitlan, state of Mexico, Mexico. *Antioxidants* 13, 874. https://doi.org/10.3390 /antiox13070874

Alıç H. (2015). Muğla yöresine ait propolis örneklerinin antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan ve quorum quenching aktivitelerinin araştırılması [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi.

Avcı T. (2021). Biyosürfaktan/ biyoemülsifiye edici üreten bakterilerin petrol türevleriyle kirlenmiş toprak örneklerinden izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Harran Üniversitesi.

Azevedo, M. A., Teixeira, J. A., Pastrana, L., & Cerqueira, M. A. (2024). Rhamnolipids: A biosurfactant for the development of lipid-based nanosystems for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *23*(1), e13252. https://doi.org/10.1111/1541-4337.13252

Bayatbalay G. (2021). Propolisle kaplanan düşük yoğunluklu polietilen filmlerin antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Namık Kemal Üniversitesi.

Beganovic, M., Luther, M. K., Rice, L. B., Arias, C. A., Rybak, M. J., & LaPlante, K. L. (2018). A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream ınfections and infective endocarditis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *67*(2), 303–309. https://doi.org/10.1093/cid/ciy064

Bettencourt, A. F., Tomé, C., Oliveira, T., Martin, V., Santos, C., Gonçalves, L., Fernandes, M. H., Gomes, P. S., & Ribeiro, I. A. C. (2021). Exploring the potential of chitosan-based particles as delivery-carriers for promising antimicrobial

glycolipid biosurfactants. *Carbohydrate polymers*, *254*, 117433. https://doi.org/10.1016/j.carbpol. 2020.117433

Bodour A.A., Miller-Maier R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *32*(3), 273-280. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00031-1

Boutoub O., El-Guendouz S., Matos I., El Ghadraoui L., Costa M.C., Carlier J.D., Falerio M.L., Figueiredo A.C., Estevinho L.M., & Miguel M.G. (2024). Chemical characterization and biological properties assessment of *Euphorbia resinifera* and *Euphorbia officinarum* Moroccan propolis. *Antibiotics*, *13*, 230. https://doi.org/10.3390/antibiotics 13030230

Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., Mitov, I., & Krastev, Z. (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal Of Medical Microbiology*, *54*(Pt 5), 481–483. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45880-0

Bravo, Z., Orruño, M., Parada, C., Kaberdin, V. R., Barcina, I., & Arana, I. (2016). The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Archives of microbiology*, *198*(5), 399–407. https://doi.org/10.1007/s00203-016-1200-1

Castaldo S., Capasso F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 51-56. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00185-5

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (Aralık, 2024). Public Health Image Library (PHIL). https://phil.cdc.gov/default.aspx

Ceresa C., Fracchia L., Williams M., Banat I.M., & Diaz De Rienzo M.A. (2020). The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. *Journal of Biotechnology*, *309*, 34-43. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.019

Ceylan, Ö., & Alıç, H. (2020). Antibiofilm, antioxidant and quorum quenching activities of propolis samples from southwest Anatolia. *Bee Studies*, *12*(2), 49-55. https://doi.org/10.51458/BSTD.2021.9

Chang, Q., Chen, H., Li, Y., Li, H., Yang, Z., Zeng, J., Zhang, P., Ge, J., & Gao, M. (2023). The synergistic activity of rhamnolipid combined with linezolid against linezolid-resistant *Enterococcus faecium*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *28*(22), 7630. https://doi.org/10.3390/molecules28227630

Chen Y.W., Ye S.R., Ting C., & Yu Y.H. (2018). Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. *Journal of Food And Drug Analysis*, 26, 761-768. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.10.002

Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, *12*(1), 547–569. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, *22*(6), 996–1006. https://doi.org/10.1128/jcm. 22.6.996-1006.1985

Çekin, A. (2023). Propolis ve 5-FU kombinasyonunun hHT-116 kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkisi [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Ege Üniversitesi.

Daverey, A., Dutta, K., Joshi, S., & Daverey, A. (2021). Sophorolipid: a glycolipid biosurfactant as a potential therapeutic agent against COVID-19. *Bioengineered*, *12*(2), 9550–9560. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1997261

de Freitas Ferreira, J., Vieira, E. A., & Nitschke, M. (2019). The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, *116*, 737–744. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.005

de Souza Araújo, L., Santana, L. A. R., Otenio, M. H., Nascimento, C. W., Cerqueira, A. F. L. W., & Rodarte, M. P. (2024). Biosurfactant production by *Pseudomonas*: a systematic review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 10.1007/s12010-024-05036-9. Advance online publication. https://doi.org/10.1007/s12010-024-05036-9

Değirmencioğlu H.T. (2018). Evaluation of phenolic profile, botanical origin, antioxidant and antimicrobial activities of Turkish propolis [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Yeditepe University.

Demirdöğen E. (2012). Tekstil fabrikası atık sularından mikroorganizma izolasyonu ve biyosürfektan üretimi [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Sütçü İmam Üniversitesi.

Dhadwal, S., Handa, S., Chatterjee, M., & Banat, I. M. (2024). Sophorolipid: An Effective Biomolecule for Targeting Microbial Biofilms. *Current microbiology*, *81*(11), 388. https://doi.org/10.1007/s00284-024-03892-6

Díaz De Rienzo, M. A., Banat, I. M., Dolman, B., Winterburn, J., & Martin, P. J. (2015). Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New biotechnology*, *32*(6), 720–726. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.009

Diaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P. S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016a). Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(13), 5773–5779. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7310-5

Díaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016b). Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. *FEMS microbiology letters*, *363*(2), fnv224. https://doi.org/10.1093/femsle/fnv224

Doğan N., Hayoğlu İ. (2012). Propolis ve kullanım Alanları. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16*(3), 39-48.

Doğanlı G.A., Ülger G., & Doğan N.M. (2016). Antibiofilm activity and chemical contents of propolis samples from Manisa-Turkey. *Hacettepe J. Biol. & Chem*. *44*(4), 505-513.

Dosler, S., & Karaaslan, E. (2014). Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, *62*, 32–37. https://doi.org /10.1016/j.peptides.2014.09.021

EUCAST, Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Version 12, 2024.

Fernandes N.A.T., Souza A.C., Simoes L.A., Reis G.M.F., Souza K.T., & Schwan R.F. (2020). Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus CCMA* 0358 as larvicidal and antimicrobial. *Microbiological Research*, *241*, 126571. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126571

Firdose, A., Chong, N. H. H., Ramli, R., & Aqma, W. S. (2023). Antimicrobial, antiadhesive, and antibiofilm actions of rhamnolipids on ESKAPE pathogens. *Letters in applied microbiology*, *76*(2), ovad013. https://doi.org/10.1093/lambio/ovad013

Firdose, A., Maeda, T., Sukri, M. A. M., Yasin, N. H. M., Sabturani, N., & Aqma, W. S. (2024). Antibacterial mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T rhamnolipids against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial pathogenesis*, *193*, 106743. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106743

Gaur, V. K., Regar, R. K., Dhiman, N., Gautam, K., Srivastava, J. K., Patnaik, S., Kamthan, M., & Manickam, N. (2019). Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresource technology*, *285*, 121314. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121314

Gomes K.O., Messias da Silva L.C.F., dos Santos R.D., Prado B.A., da Silva Montes P., & Silva Rodrigues L.F. (2024). Chemical characterization and antibacterial activities of Brazilian propolis extracts from *Apis mellifera* bees and stingless bees (Meliponini). *Plos One*, *19*(7) : e0307289. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0307289

Habibah, F. F., Sri Rizki, W. O., Ivansyah, A. L., Astuti, D. I., & Hertadi, R. (2024). Green synthesis of copper ions nanoparticles functionalized with rhamnolipid as potential antibacterial agent for pathogenic bacteria. *Heliyon*, *10*(1), e24242. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24242

Haque, F., Alfatah, M., Ganesan, K., & Bhattacharyya, M. S. (2016). Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth. *Scientific reports*, *6*, 23575. https://doi.org/10.1038/srep23575

Hendri N.A.M., Amdan N.A.N., Dounis S.O., Najib N.S., & Louis S.R. (2024). Ultrastructural and morphological studies on variables affecting *Escherichia coli* with selected commercial antibiotics. *The Cell Surface*, 11, 100120. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2024.100120

Herrera-Hidalgo, L., de Alarcón, A., López-Cortes, L. E., Luque-Márquez, R., López-Cortes, L. F., Gutiérrez-Valencia, A., & Gil-Navarro, M. V. (2020). *Enterococcus faecalis* Endocarditis and Outpatient Treatment: A Systematic Review of Current Alternatives. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(10), 657. https://doi.org/10.3390/antibiotics9100657

ISO, (2019). ISO 20776–1: Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility devices. Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization.

Joshi-Navare, K., & Prabhune, A. (2013). A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *BioMed Research International*, *2013*, 512495. https://doi.org/10.1155/2013/512495

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. International journal of molecular sciences, 22(6), 3128. https://doi.org/10.3390/ijms22063128

Kaya E.G., & Özbilge H., Albayrak S., (2012). Kayseri propolisinin etanolik ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi. *Selçuk Tıp Dergisi*, *28*(4), 209-212.

Kaya T., Kariptaş E., Aslım B. (2007). Biyosürfektanlar ve Biyoteknolojik Önemi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 8(2), 325-335.

Ko, S. J., Kim, M. K., Bang, J. K., Seo, C. H., Luchian, T., & Park, Y. (2017). *Macropis fulvipes* venom component macropin exerts its antibacterial and anti-biofilm properties by damaging the plasma membranes of drug resistant bacteria. *Scientific reports*, *7*(1), 16580. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16784-6

Kosaric N. (2001). Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, *39*(4), 295-304.

Kösedağ M., & Gülaboğlu M. (2022). Effectiveness of propolis in the treatment of Covid-19. *International Journal of PharmATA*. *2*(3): 82–86.

Kumar, A., Singh, S. K., Kant, C., Verma, H., Kumar, D., Singh, P. P., Modi, A., Droby, S., Kesawat, M. S., Alavilli, H., Bhatia, S. K., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Chung, S. M., & Kumar, M. (2021). Microbial biosurfactant: A new frontier for

sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(9), 1472. https://doi.org/10.3390/antiox10091472

Kutluca S., Genç F., & Korkmaz A. (2008). *Propolis*. Samsun İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını.

Laxminarayan, R., Impalli, I., Rangarajan, R., Cohn, J., Ramjeet, K., Trainor, B. W., Strathdee, S., Sumpradit, N., Berman, D., Wertheim, H., Outterson, K., Srikantiah, P., & Theuretzbacher, U. (2024). Expanding antibiotic, vaccine, and diagnostics development and access to tackle antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)*, *403*(10443), 2534–2550. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00878-X

Leitão J. H. (2020). Microbial virulence factors. *International Journal Of Molecular Sciences*, *21*(15), 5320. https://doi.org/10.3390/ijms21155320

Lydon, H. L., Baccile, N., Callaghan, B., Marchant, R., Mitchell, C. A., & Banat, I. M. (2017). Adjuvant antibiotic activity of acidic sophorolipids with potential for facilitating wound healing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(5), e02547-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02547-16

Mahanty R., Saha I., Halder J., Rajwar T.K., Dash P., Das C., Pradhan D., Sarangi M.K., Dubey D., Rai V.K., Kar B., Ghosh G., & Rath G. (2024). Biosurfactant-based silver nanoparticles: Recent advances and their applications in antimicrobial drug resistance. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *92*, 105382. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105382

Mandal, S. M., Barbosa, A. E., & Franco, O. L. (2013). Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology advances*, *31*(2), 338–345. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.004

Marco D.S., Piccioni M., Pagiotti R., & Pietrella D. (2017). Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5163575 https://doi.org/10.1155/2017/5163575

Martinez A., Manrique-Moreno M., Klaiss-Luna M.C., Stashenko E., Zafra G., & Ortiz C. (2021). Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, *10*, 1474. https://doi.org/10.3390/antibiotics10121474

Martinson, J. N. V., & Walk, S. T. (2020). *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus*, *9*(1). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2020

Meccatti V.M., Martins K.M.C., Ramos L.P., Pereira T.C., de Menezes R.T., Marcucci M.C., Abu Hasna A., & de Oliveira L.D. (2023). Synergistic antibiofilm action of cinnamomum verum and brazilian green propolis hydroethanolic extracts against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* and their biocompatibility on human keratinocytes. *Molecules*, 28, 6904. https://doi.org/10.3390/molecules28196904

Mnif I., & Ghribi D. (2016). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. *96*(13), 4310–4320. https://doi.org/10.1002/jsfa.7759

Moncla B.J., Guevara P.W., Wallace J.A., Marcucci M.C., Nor J.E., & Bretz W.A. (2012). The inhibitory activity of typifi ed propolis against *Enterococcus* species. *Z. Naturforsch 67c*, 249-256. https://doi.org/10.1515/znc-2012-5-603

Nadar, S., Khan, T., Patching, S. G., & Omri, A. (2022). Development of antibiofilm therapeutics strategies to overcome antimicrobial drug resistance. *Microorganisms*, *10*(2), 303. https://doi.org/10.3390/microorganisms10020303

Nalbantsoy A., Sarıkahya N.B., Özverel C.S., Barlas A.B., Kırcı D., Akgün İ.H., Yalçın T., Düven G., Kışla D., Demirci B., Topcu G., & Gören A.C. (2022). Chemical composition and biological activities of Cypriot propolis. *Journal of Apicultural Research*, *61*(2): 233-245. https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1977028

Nasırlı F. (2020). Propolis alt fraksiyonlarının antibiyofilm ve antikanser etkilerinin aydınlatılması [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Pamukkale Üniversitesi.

Nguyen, B. V. G., Nagakubo, T., Toyofuku, M., Nomura, N., & Utada, A. S. (2020). Synergy between sophorolipid biosurfactant and SDS increases the efficiency of *P. aeruginosa* biofilm disruption. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces And Colloids*, *36*(23), 6411–6420. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00643

Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(Pt 4), 519–523. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0

Ohadi M., Forootanfar H., Dehghannoudeha G., Eslaminejad T., Ameri A., Shakibaie M., & Adeli-Sardou M., (2020). Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103806. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103806

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*, *7*(1), 199. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1

Özdefne M. (2014). *Bacillus subtilis* kullanılarak atık ekmeklerden proteaz ve biyosürfektan üretimi [Yayımlanmamış Doktora Tezi]. Çukurova Üniversitesi.

Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International journal of molecular sciences*, *22*(18), 9922. https://doi.org/10.3390/ijms22189922

Pal S., Chatterjee N., Das A.K., McClements D.J., & Dhar P. (2023). Sophorolipids: A comprehensive review on properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science, 313*, 102856. https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102856

Perez, C., Pauli, M., & Bazerque, P. (1990). An antibiotic assay by agar well diffusion method. *Acta Biologiae et Medicinae Experimentalis, 15*, 113-115.

Pimenta, H. C., Violante, I. M., Musis, C. R., Borges, Á. H., & Aranha, A. M. (2015). In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. *Brazilian oral research, 29*, S1806-83242015000100255. https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0058

Polat A., Akdeniz H., & Turhan M. (2023). Arı ürünü olan propolis'in yapısı ve özellikleri. *Uluslararası Gıda Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, *3*(1), 55-63.

Procop, G.W., Church, D.L., Hall, Geraldine S., Janda W.M. Koneman, E.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L. (2017). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (7th ed.). Wolters Kluwer.

Przybylek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(11), 2047. https://doi.org/10.3390/molecules24112047

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, *7*(4), 493–512. https://doi.org/10.4155/fmc.15.6

Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *52*(4), 1701–1718. https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x

Saadati, F., Shahryari, S., Sani, N. M., Farajzadeh, D., Zahiri, H. S., Vali, H., & Noghabi, K. A. (2022). Effect of MA01 rhamnolipid on cell viability and expression of quorum-sensing (QS) genes involved in biofilm formation by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, *12*(1), 14833. https://doi.org/10.1038/s41598-022-19103-w

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(10), 608–620. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0

Sen R. (2010). *Biosurfactants*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.

Sforcin J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research: PTR*, *30*(6), 894–905. https://doi.org/10.1002/ptr.5605

She P., Wang Y., Li Y., Zhou L., Li S., Zeng X., Liu Y., Xu L., & Wu Y. (2021). Drug Repurposing: In vitro and in vivo antimicrobial and antibiofilm effects of bithionol against *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 579806. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.579806

Shikha S., Chaudhuri S.R., & Bhattacharyya M.S., (2020). Facile one pot greener synthesis of sophorolipid capped gold nanoparticles and its antimicrobial activity having special efcacy against Gram negative *Vibrio cholerae*. *Scientific Reports* 10:1463. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57399-3

Shu Q., Lou H., Wei T., Zhang X., Chen Q., (2020). Synergistic antibacterial and antibiofilm effects of ultrasound and MEL-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72, 10545. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105452

Shu, Q., Lou, H., Wei, T., Liu, X., & Chen, Q. (2021). Contributions of glycolipid biosurfactants and glycolipid-modified materials to antimicrobial strategy: a review. *Pharmaceutics*, 13(2), 227. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020227

Sidrim, J. J., Ocadaque, C. J., Amando, B. R., de M Guedes, G. M., Costa, C. L., Brilhante, R. S., A Cordeiro, R., Rocha, M. F., & Scm Castelo-Branco, D. (2020). Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors. *Future microbiology*, *15*, 1109–1121. https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0010

Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(1), 2–13. https://doi.org/10.1111/jam.14057

Temel A., Eraç B. (2020). Küresel bir tehdit: *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları, antimikrobiyal dirençte güncel durum ve alternatif tedavi yaklaşımları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *77*(3), 367-378.

Thakur P., Saini N.K., Thakur V.K., Gupta V.K., Saini r.v., Saini A.K., (2021). Ramnolipid the glycolipid biosurfactant: emerging trends and promising strategies in the feld of biotechnology and biomedicine. *Microbial Cell Factories* 20 :1. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01497-9

Totsingan, F., Liu, F., & Gross, R. A. (2021). Structure-activity relationship assessment of sophorolipid ester derivatives against model bacteria strains. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(10), 3021. https://doi.org/10.3390/molecules26103021

Uğur, İ., Eyigör, A., & Temelli, S. (2021). Bazi Hastaliklarin Tedavisinin Desteklenmesinde Propolis Kullanınmının Önemi. *Veteriner Farmakoloji Ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12(2), 118-140. https://doi.org/10.38137/vftd.962340

Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and

biotechnology. *Biotechnology advances*, *24*(6), 604–620. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.001

Vieira, I.M.M., Santos, B.L.P., Ruzene, D.S., & Silva, D.P. (2021). An overview of current research and developments in biosurfactants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 1–18. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.017

WHO, 2024. Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization. Geneva.

Yamasaki, R., Kawano, A., Yoshioka, Y., & Ariyoshi, W. (2020). Rhamnolipids and surfactin inhibit the growth or formation of oral bacterial biofilm. *BMC microbiology*, *20*(1), 358. https://doi.org/10.1186/s12866-020-02034-9

Yapucu A. (2016). Çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin kontrolü için alternatif bir yaklaşım [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi.

Yıldırım K. (2017). *Çevreyi* algılama sistemi inhibitörlerinin antibiyotiklerle kombinasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin araştırılması [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Marmara Üniversitesi.

Yılmaz E.Ş., (2001). Biyosürfektanların antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Mustafa Kemal Üniversitesi.

Yılmaz İ. (2022). Doğu akdeniz florasına ait bazı endemikve tıbbi aromatik bitkilerin invitro koşullarda antibiyofilm, antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Kahramanmaraş SütçüİmamÜniversitesi.

Zhang W., Margarita G.E., Wu D., Yuan W., Yan S., Qi S., Xue X., Wang K., & Wu L. (2022). Antibacterial activity of chinese red propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules*, 27, 1693. https://doi.org/10.3390/molecules27051693

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

Turkoglu B.N., Adaleti R., Rayaman E., (202X). Antimicrobial and antibiofilm activity of rhamnolipid and sophorolactone on some pathogenic bacteria. *Journal of Research in Pharmacy*, (08.10.2024 tarihinde yayına kabul edilmiştir).

Bildiri (Poster veya Sözel)

Türkoğlu B.N., Rayaman E., (2024, 19-20 Şubat). *Biyosürfektanların Antimikrobiyal Etkinliği* [Sözlü sunum]. Gevher Nesibe İnternational Health Sciences Conference-XII, Ankara, Türkiye.

Türkoğlu B.N., Rayaman E., Adaleti R., (2019, 23-24 Kasım). *Bazı Patojen Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi* [Poster sunumu]. Gevher Nesibe 4. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Ankara, Türkiye.

Proje

Türkoğlu, B. & Rayaman, E. Patojen Mikroorganizmalarda Biyosürfektan Üretiminin, Bazı Biyosürfektan Maddeler ile Propolisin Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (SAG-C-YLP-080519-0176), 2018-2025.