

## Pinus nigra L. ve Pinus brutia L. (Çam) Alkollü Kabuk Ekstraktlarının Pseudomonas aeruginosa ve Chromobacterium violaceum'a Karşı Anti-QS Aktivitesi Yoluyla Virülans Faktörlerinin Üretim Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

### Evaluation of the Effect of Pinus nigra L. and Pinus brutia L. (Pine) Alcoholic Bark Extracts on Production Potential of Virulence Factors About Anti-QS Activity Against Pseudomonas aeruginosa and Chromobacterium violaceum

Bashar IBRAHIM <sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



## Ö Z E T

Bitkilerin belirgin çevreyi algılama (QS) inhibisyon aktivitesi, bakteriyel patojeniteyi azaltmak için yeni bir müdahale stratejisi olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, metanol ile hazırlanan iki farklı çam türü (Pinus nigra L. ve Pinus brutia L.) kabuk ekstraktlarının, Pseudomonas aeruginosa PAO1 ve Chromobacterium violaceum bakterilerin Quorum Sensing (QS)'ye bağlı virülans faktörlerinin üretim potansiyeli üzerindeki aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ekstraktları, elde etmek için ultrasonik destekli ekstraksiyonlar yapılmıştır. Sonuçlar, ekstraktların her iki bakteri suşu üzerinde farklı oranlarla istatistiksel yönden anlamlı olmakla birlikte P. nigra kabuk ekstraktın daha etkili olduğunu göstermiştir. Pinus brutia L ekstraktının, kayma hareketi üzerinde inhibisyon oranı (%77) gösterirken Pinus nigra L ekstraktının inhibisyon oranı (%80) daha yüksek bulunmuştur.. Ayrıca, Pinus nigra ekstraktının P. aeruginosa PAO1'e karşı elastaz dışında piosiyenin üretimi ve biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisi, sırasıyla %62 ve %54 olarak Pinus brutia ekstraktına göre (%41,%51) daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler P. nigra ve P. brutia ekstraktlarının piosiyenin, elastaz, viyolasein üretimi, biyofilm oluşumu ve kayma hareketliği dahil olmak üzere fenotipe güçlü bir şekilde müdahale ettiğini ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar, çam kabuğu ekstraktlarının anti-QS ajanlar olarak potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Pinus nigra L, Pinus brutia L., Pseudomonas aeruginosa PAO1 ,Chromobacterium violaceum, Çevreyi algılama, virülans

Alınış / Received: 10.06.2022 Kabul / Accepted: 21.08.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 31.08.2022



## ABSTRACT

The apparent Quorum Sensing (QS) inhibition activity of plants could be used as a new intervention strategy to reduce bacterial pathogenicity. This study, it was aimed to investigate the activities of the bark extracts of two different pine species (*Pinus nigra* L. and *Pinus brutia* L) prepared with methanol on the production potential of Quorum Sensing (QS)-dependent virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Chromobacterium violaceum* bacteria. Ultrasonic-assisted extractions were performed to obtain the extracts. The results showed that the extracts were statistically significant at different rates on both bacterial strains, but the *P. nigra* bark extract was more effective. *Pinus brutia* bark extract showed an inhibition rate (77%) on swarming motility. The bark extract of *Pinus nigra* had a higher inhibition rate (80%). In addition, the inhibition effect of *Pinus nigra* bark extract against *P. aeruginosa* PAO1 on pyocyanin production and biofilm formation other than elastase, inhibition rates of 62% and 54%, respectively, were higher than *Pinus brutia* bark extract (41%, 51%). Our study revealed that *Pinus nigra* L. and *Pinus brutia* L. bark extracts strongly interfere with the phenotype, including pyocyanin, elastase, Violasein production, biofilm formation, and swarm motility. These results may indicate the potential use of pine bark extracts as anti-QS agents.

**Keywords:** *Pinus nigra* L., *Pinus brutia* L., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Chromobacterium violaceum*, Quorum Sensing, Virulence,



## 1. Giriş

Antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı sonucu ortaya çıkan çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu hastane enfeksiyonları tüm dünyada hekimlerin korkulu rüyasıdır. Mevcut konvansiyonel antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve bu tür bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin yetersiz kalması, etkili tedavi seçenekleri geliştirmek için yeni stratejilere acil ihtiyaç olduğunu göstermektedir [1,2]. Biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda mortalite ve morbiditeyi artıran durumlardır. Nitekim son yıllarda yeni antibiyotik keşifleri yavaşlarken, çoklu antibiyotik dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve antibiyotikler etkinliğini büyük ölçüde kaybetmeye başlamıştır [3]. Bu nedenle bakterilere karşı yeni stratejiler kullanmak gerekli hale gelmiştir. Yeni antibiyotik geliştirme araştırmaların yanı sıra bakterileri öldürmek yerine virulent sistemlerin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır.

Günümüzde bakteri duvarı dışında yeni terapötik hedefler bulunmuştur. Hücreler arası “çevreyi algılama” ya da “Quorum Sensing” olarak da adlandırılan bu mekanizma bakterilerde biyofilm oluşumu ve virülans faktörlerinin (elastaz ve piyosiyenin) üretimi gibi önemli rol oynayabilen spesifik genleri düzenleyerek, bakteri popülasyonlarının davranışlarını koordine etmelerini sağlayan düzenleyici bir iletişim mekanizmasıdır. Bu nedenle, bu mekanizmanın inhibisyonu, antibiyotik direncinin üstesinden gelmek için ilaç keşif programlarında alternatif bir tedavi stratejisi olarak araştırılmaktadır [4]. Bitkiler uzun süredir tıpta tedavi amacıyla kullanılmaktadır [5] ve insanların yaklaşık %80'inin hastalıkları tedavi etmek için tıbbi bitkilere güvendiği tahmin edilmektedir [6].

Türkiye'de diğer birçok ülkede olduğu gibi tıbbi açıdan önemli bitkiler geleneksel olarak tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır [7]. Bitkilerin tıbbi amaçlı kullanımı bugüne kadar birçok geleneksel tıp sisteminin temelini oluşturmuştur ve günümüzde de tedavi açısından insanlığa yeni umutlar sunmaya devam etmektedirler [8].

Yakın zamanda tıbbi bitkilerin çeşitli kısımları üzerinde yapılan çalışmalar, tıbbi bitkilerin antioksidan, antidiyabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, hepatoprotektif, antikanser, antiinflamatuvar, antiviral ve

antimikrobiyal aktiviteler gibi geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahip olduğunu göstermiştir [9,10]. Bakterilerin hücre dışı virulans faktörlerinin salınımı QS mekanizma ile kontrol edilip düzenlenmektedir [11,12]. Yapılan çalışmalar, tıbbi bitkilerin potansiyel QS inhibitörlerinin bakteriyel patojeniteyi azaltabileceğini ve hücreleri öldürmek yerine bakteriyel QS sistemlerini hedefleyip, direnç geliştirmek için seçici basıncı azaltıp veya yavaşlatabileceğini göstermiştir [11,13]. Bu bağlamda bitkilerin tıbbi amaçlı kullanımı birçok hastalığın tedavisinde özellikle mikroorganizmalarla mücadelede bir çözüm olmuş ve umut verici bir strateji olarak benimsenmiştir [14]. Çalışmamızda kullandığımız *Pinus brutia* L. (kızılcım) ve *Pinus nigra* L. (karaçam) Pinaceae familyası içerisinde yer alıp, Türkiye'de en geniş yayılış alanına sahip türlerdir. Bilimsel literatürlere göre etnobotanik kullanımları diğer türlere göre daha fazla gözlenmiştir [15]. Çam kabuğu, kozalak ve iğne gibi orman atıklarının kullanımı ilgi çekici olduğu kadar, aynı zamanda sayı ve kapsamı sınırlı kalmış bir konudur. Özellikle belirli çam türleri ve bunlar arasında çalışmamızda seçilen 2 tür (*Pinus brutia*, *P. nigra*) hakkında yapılan çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur [16,17,18]. Bu bilgiler doğrultusunda antibiyotiklere ve çevresel koşullara karşı artan mikrobiyal direnç için doğal ürünleri kullanmak umut verici bir tedavi yöntemi olabilir.

Bu nedenle bu çalışmada, *Pinus nigra* ve *P. brutia* kabuk ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ve *Chromobacterium violaceum* bakterilerinin QS'ye bağlı virülans faktörlerinin üretim potansiyeli üzerindeki aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### Bitki Materyali ve Ekstrakt Hazırlama

Araştırmada kabukları kullanılan iki çam türü (*Pinus nigra* ve *P. brutia*) ticari olarak temin edilmiştir. Numuneler bir blender (Waring 8011 EB, Amerika) yardımıyla toz haline getirildi. 5.5 g toz numune tartıldı ve 50 mL metanol ilave edildi. Daha sonra toz numune 45 dakika ultrasonik banyoda (Elmasonic P, Almanya) ekstrakte edildi. Daha sonra çözücü rotavapor (Heidolph Hei-Vap Döner Evaporatör, İngiltere) yardımıyla 40-45 °C'de uzaklaştırıldı. İşlem sonunda verim hesaplandı.

### Antibakteriyel Aktivite

Mevcut çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji ve İmmünoloji ABD bakteri stokuğundan elde edilen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ve *Chromobacterium violaceum* kullanıldı.

### QS İnhibitör Aktivitesi

### Biyofilm Oluşumu Deneyi

*Pinus* türlerinin kabuk metanol ekstraktlarının bakteriyel biyofilm üzerindeki etkisi kristal viyole (CV) testine göre araştırıldı [19]. Kuyucuklarda bulunan Luria-Bertani broth (LB) besi ortamına farklı konsantrasyonlarda ekstraktlar eklendi. Kuyucuklara 5 µl PAO1 kültürü yapıp 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra plaka içeriği döküldü ve planktonik bakterileri uzaklaştırmak için 3-5 kez yıkandı. Daha sonra kuyucuklara %0.1 konsantrasyonda CV eklendi ve 30 dakika sonra tekrar 3-5 kez saf su ile yıkandı. Ardından %95 metanol eklenerek 15 dakika bekletildi. Optik Yoğunluk (OD) değerleri (Epoch Microplate Spectrophotometer) 570 nm'de kaydedildi. Referans PAO1 suşu bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol steril LB idi. Ekstraktların biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

\*OD: Optik Yoğunluk

İnhibisyon oranı (%) = [ (kontrolde OD – tedavide OD) × 100 ] / kontrolde OD

### Elastolitik Deneyi

Ekstraktların elastolitik aktivitesi, Ohman ve ark.'nın yöntemine göre Elastin Congo Red (ECR; Sigma-Darmstadt, Almanya) testi ile belirlendi [20]. Bu yöntemle her bir kuyucuğa 100 µL bitki özütü ilave edildi ve OD değeri 600 nm'de belirlendi. Daha sonra inkübatör çalkalayıcıda 37°C'de 14-16 saat bekletildi. Kültürün 100 µl süpernatant kısmı bir tüpe aktarıldı ve üzerine 900 µl ECR tamponu eklendi.

Elde edilen karışım 37°C'de 3 saat 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Numunenin süpernatantı bir küvete aktarıldı ve 495 nm dalga boyunda optik absorpsiyonu spektrofotometrik olarak okundu (BioTek-Epoch 2 Mikroplaka Spektrofotometre). PAO1 kültürü ve LB, sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak kullanıldı. Testler üç kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı.

### **Piyosyanin İnhibisyon Deneyi**

Ekstraktların piyosyanin pigment üretimi üzerindeki etkisi, Essar ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemle yapıldı [21]. Ekstrakt piyosyanin pigment üretimi üzerindeki inhibitör etkisini araştırmak için 600 nm'de 0,05 OD'de üretilen bir PAO1 bakteri kültürü kullanıldı. LB ortamı içeren şişelere 100 µL bitki ekstraktı ilave edildi. Daha sonra 37 °C'de çalkalanarak 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodundan sonra ortama 5 mL kloroform ilave edildi ve 30 saniye vortekslendi. Daha sonra şişelerin dibindeki kloroformdan ayrılan faz (2 mL) alınarak cam tüplere yerleştirildi. Buna 1 mL HCL-su karışımı eklendi ve tekrar 30 saniye vortekslendi. Tüplerin yüzeyinde oluşan pembe faz OD 520 nm'de okundu ve kaydedildi. Testler üç kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı.

### **Kayma Motilitesi**

Kayma motilitesi swarm agar (SA) testi Rashid ve ark.'nın yöntemine göre ile yürütüldü. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, 37°C'de çalkalayıcı bir inkübatör ile LBB ortamında gece boyunca üretildi. İnkübasyon sonunda steril tüpe alındı ve 4500 devir dk-1' de 5 dk santrifüj edildi. Ekstraktlardan 200 µL alınarak 20 ml swarm agar ortamı ile karıştırıldı ve petri kaplarına döküldü. Her bir petrinin merkezine 5 µL bakteriyel süpernatant aşılansarak 10-15 dakika kurumaya bırakıldı ve 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi [22]. kayma hareketliliği aşılama noktasından dışa doğru yayılmanın çapı ölçülerek test edildi. Sonuçlar, kontrol ortamında PAO1 suşu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Testler üç kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı.

### **Viyolasin Pigment Üretimini İnhibisyonu**

*Chromobacterium violaceum* 12472 üzerinde *Pinus nigra* ve *P. brutia* kabuk ekstraktlarının viyolasin üretimini önleyici aktivitesini ölçmek için spektrofotometrik inkübasyon deneyi kullanıldı [23]. Bu deneyde 100 µL bitki ekstraktına 5 ml LBB ortamı eklendi ve bir gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde 30 °C de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 mL bakteri kültürü 13000 dev dk-1'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant çıkarıldı üzerine 1 mL DMSO ilave edilerek 30 saniye boyunca vortekslendi. 10 dakika boyunca 13000 dev/dak-1'de tekrar vorteks işleminden sonra, violaseinli süpernatant 585 nm'de okundu.

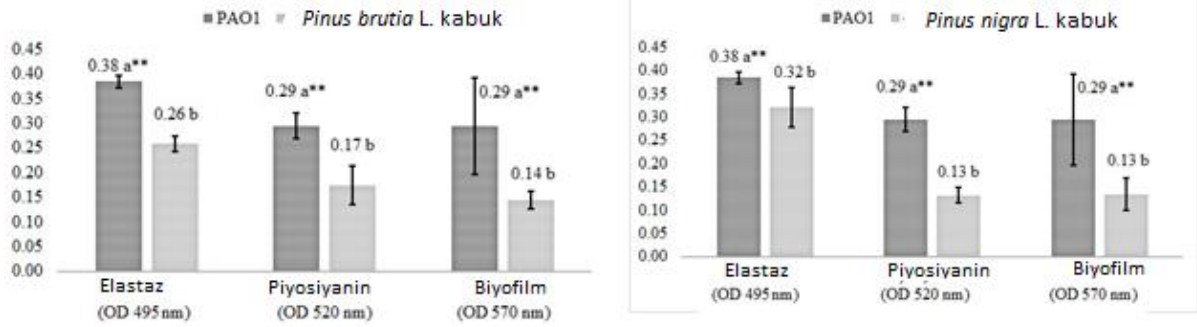
### **İstatistiksel Analiz**

Deneyler, rastgele parsel tasarımına göre üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler, JUMP yazılımı ile varyans analizine tabi tutulmuş ve sonuçların ortalamaları arasındaki farklar LSD çoklu karşılaştırma testine göre harflerle karşılaştırılmıştır.

## **3. Bulgular**

### **Anti-QS Etkinliği**

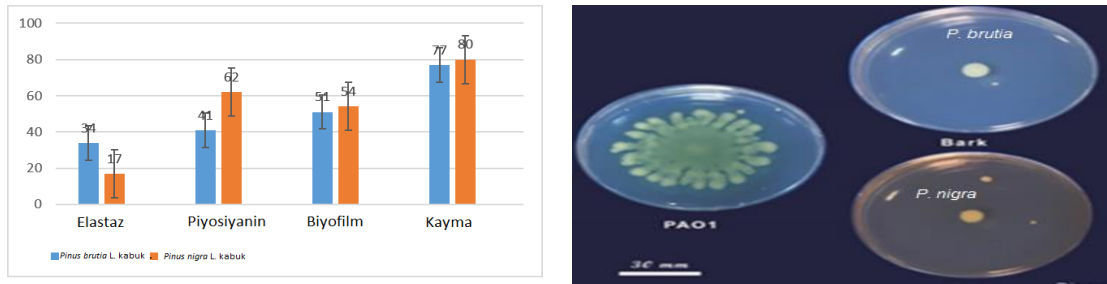
Bu çalışmada, *Pinus brutia* L. ve *P. nigra* L. metanol ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa* virulansında önemli rolü olan üç faktöre karşı inhibitör etkisi olduğu tespit edilmiştir. *P. brutia* L. ekstraktının farklı dalga boylarında [OD(495,520,570)] absorbans değerleri elde edilerek elastaz, piyosyanin ve biyofilm oluşumu üzerindeki etki inhibisyon oranları sırasıyla %34, %41, %55 olarak saptanırken, *P. nigra* ekstraktının oranları %17, %62, %54 olarak saptanmıştır. Elastaz inhibisyon etkisi *P. nigra* ekstraktının *P. brutia*'ya göre daha düşük olarak gözlenirken, *P. nigra* ekstraktının biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisi ise *P. brutia*'ya göre daha yüksek saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1: *Pinus brutia* ve *P. nigra* kabuk ekstraktlarının anti-quorum algılama aktivitesi \*\*Farklı harflerle ortalamalar arasındaki fark önemlidir,  $p < 0.01$  (SD $\pm$ )

*P. brutia*, *P. nigra*'nın kabuk ekstraktlarının kayma hareketi üzerine etkisi ise PAO1 için 54 mm iken; *P. brutia* L. ekstraktının eklendiği (75 mg/mL) petri de 12 mm, *P. nigra*'nın eklendiği (75 mg/mL) petri de ise 11 mm olarak bulunmuş ve elde edilen bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 2).

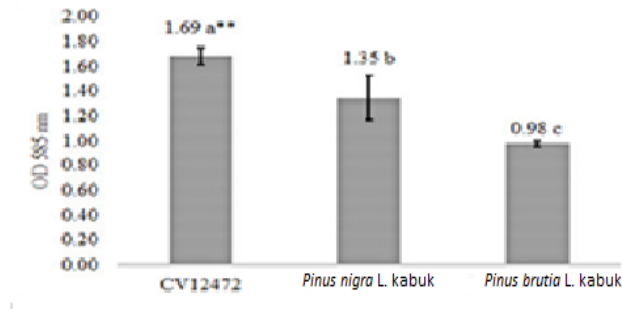
Elde edilen sonuçlar; *P. brutia* L., *P. nigra* L. kabuk ekstraktlarının PAO1 üzerinde elastaz, piyosiyenin, biyofilm oluşumu ve kayma hareketi üzerinde göstermiş oldukları inhibisyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0.01$ ).



Şekil 2: *Pinus brutia* ve *P. nigra* kabuk ekstraktlarının bakteriler üzerinde önleyici aktivitesi \*\*Farklı harflerle ortalamalar arasındaki fark önemlidir,  $p < 0.01$  (SD $\pm$ ) Neyi önleyici aktivitesi, belirgin değil. Ayrıca kayma motilitesi ile ilgili bulgulardan bahsedilmeli

### Viyolasin İnhibisyonu

Besiyerinde merkezden duvara yayılma ölçülerek değerlendirilen *C. violaceum* 12472 üzerinde *Pinus nigra* ve *P. brutia* kabuk ekstraktlarının viyolasin önleyici aktivitesinin araştırıldığı deney sonucunda, 50 mg konsantrasyonda %21 inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edilmiştir ( $p < 0.01$ ) (Şekil 3).



Şekil 3: Ekstraktların viyolasin üretimi üzerindeki inhibisyon etkisi\*\*Farklı harflerle ortalamalar arasındaki fark önemlidir,  $p < 0.01$  (SD $\pm$ )

## 4. Tartışma ve Sonuç

Bulaşıcı hastalıklar insanlığın varoluşundan bu yana tüm toplumları etkileyen en önemli sorunlardan biri olmuştur. Bu enfeksiyonlara neden olan bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* özellikle immünosupresif hastalarda öldürücü bir etkidir. Antimikrobiyal tedavi başarısızlığı ile ilişkili en büyük sorun direncin ortaya çıkmasıdır. Ayrıca, *P. aeruginosa* hücreleri, elastaz, piyosiyanın, biyofilm gibi virülans faktörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesini ve ikincil metabolitlerin üretimini ilişkilendiren küçük sinyal moleküllerini sentezleyerek QS yoluyla iletişim kurar. Kontrolsüz antibiyotik kullanımının ve bakterilerde direnç genlerinin transferinin antibiyotiğe dirençliliğin ortaya çıkmasına neden olduğu ve bu nedenle bulaşıcı hastalıklarla mücadelede zorluklar yarattığı bilinmektedir [2,3].

Bakteri virülansı, solunum yolu, damar sistemi ve idrar yolu dahil olmak üzere çeşitli vücut sistemlerindeki hastane enfeksiyonlarından sorumludur [24]. Piyosiyanın, *P. aeruginosa* tarafından üretilen bir pigmenttir ve özellikle akciğer enfeksiyonlarına neden olmada etkilidir [25]. Ek olarak, piyosiyanın biyolojik membranlara kolayca nüfuz edebilir ve özellikle kistik fibrozlu hastalardan büyük miktarlarda izole edilebilir [21]. Bu nedenlerle piyosiyanın üretiminin azaltılması bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde hayati öneme sahiptir.

Bu bağlamda geleneksel tıp sistemlerinde sıklıkla kullanılan bitkiler, modern ilaç endüstrisinde de aktif olarak kullanılmakta ve bilinen etken maddeleri ile çeşitli hastalık durumlarına karşı kullanılmaktadır. Çam kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmış olmasına rağmen *Pinus brutia* ve *P. nigra* türlerinin kabuk ekstraktlarının antibakteriyel ve anti-QS aktivitelerinin henüz çalışılmadığı gözlenmiştir. Ancak bir çalışmada *Pinus brutia* var. *eldarica* (İran çamı) türünün *P. aeruginosa*'ya karşı etkili olduğu ve virülans faktörünü önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir ( $P < 0.001$ ) [16]. Mevcut çalışmada, çam kabuğu ekstraktlarının *P. aeruginosa*'ya karşı virülans ve biyofilm oluşumunun düzenlenmesi üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Gram negatif fırsatçı bir patojen olan *Chromobacterium violaceum* cilt lezyonu çoklu karaciğer ve akciğer apselerine ve ölümcül septisemiye neden olmaktadır [25]. Yapılan bir çalışmada, *Pinus pinaster* Aiton subsp. *atlantica* hidro-etanolü kabuk ekstraktları 0.25, 0.50 ve 80.00 mg/mL konsantrasyonlarda Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olmasına rağmen test edilen bütün Gram negatif bakterilere karşı inhibisyon etkisi göstermemiştir [26]. Bunun nedeni Gram negatif bakteriler, makro moleküllere ve hidrofobik bileşenlere karşı bir bariyer oluşturan dış lipopolisakkarit yapısı nedeniyle doğal veya sentetik moleküllere karşı daha dirençlidir [27,28]. Ancak bazı bitki ekstraktlarının hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin zar geçirgenliğini artırarak makro moleküllerin hücre dışına sızmasına neden olduğu bildirilmiştir [30,31]. Çalışmamızda *Pinus brutia* ve *P. nigra* ağaç kabuğu ekstraktlarının *C. violaceum*'a karşı anlamlı düzeyde inhibisyon aktivitesi umut verici bir strateji olarak görülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, bakteriyel iletişimi sınırlayarak güçlü bir doğal anti-quorum sensing ajanı olarak *Pinus nigra* ve *P. brutia* ekstraktlarının kullanılabileceğiyle ilgili heyecan verici sonuçlar göstermiştir. *P. nigra* ve *P. brutia* türleri elastaz, piyosiyanın ve biyofilmler dahil olmak üzere *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerinin üretimini azaltarak etki mekanizmasına ilişkin ilk rapordur. Kayma hareketliliği ve bakteriyel iletişimden sorumlu olan QS sistemi inhibisyonunu *P. nigra* ve *P. brutia* ekstraktlarını kullanarak sınırlandırıldı. *P. nigra* ve *P. brutia* ekstraktlarının diğer doğal antibakteriyel bileşiklerle kombinasyon halinde diğer bulaşıcı mikroorganizmalar ve özellikle mayalar üzerindeki etkisini belirlemek için çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Etik Beyanı

*Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.*

## Kaynakça

[1] Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N., et al. 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep*, 27(2),238-54.

- [2] Malik, B., Bhattacharyya, S. 2019. Antibiotic drugresistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Scientific Reports*, 9(1),9788.
- [3] Terreni M, Taccani, M., Pregnolato, M. 2021. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*, 26(9), 2671.
- [4] Medarametla, P., Kronenberge,r T., Laitinen, T., Poso, A. 2021. Structural Characterization of LsrK as a Quorum Sensing Target and a Comparison between X-ray and Homology Models. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 61(3), 1346–1353.
- [5] Zhao X, Yu Z, Ding T. 2020. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*. 8(3), 425.
- [6] Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, JA., Agugliaro, FM. 2020. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(10):3376.
- [7] Tuasha N, Petros B, Asfaw Z. Medicinal Plants Used by Traditional Healers to Treat Malignancies and Other Human Ailments in Dalle District, Sidama Zone, Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*.14(1),15.
- [8] Aziz, M.A., Khan, A.H., Adnan, M., Ullah, H. 2018. Traditional Uses of Medicinal Plants Used by Indigenous Communities for Veterinary Practices at Bajaur Agency, Pakistan *J Ethnobiol Ethnomed*. 29;14(1):11.
- [9] Jachak SM, Saklani A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Current Science*. 2007;92: 1251-1257.
- [10] Li YY, Feng J, Zhang XL, Cui YY. Pine bark extracts: nutraceutical, pharmacological, and toxicological evaluation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;353:9–16.
- [11] Önem, E., Çevikbaş, H. 2018. Antibacterial Effect of *Hypericum atomarium* Boiss. Extracts against Clinical *Staphylococcus* spp. *Suleyman Demirel University Faculty of Arts and Sciences Journal of Science*,13(2), 164-172.
- [12] Önem, E., Sarısu, H.C., İbrahim, B. 2020. The Effect of *Rheum ribes* L. Extracts on Bacterial Communication and Antibacterial Activity. *Journal of Health Sciences*, 11(4), 436-442.
- [13] Gündoğdu, S., Uçar, Ü., Uz, A.K. 2021. SOURCES OF RESVERATROL AND ITS MEDICINAL SIGNIFICANCE. *J. Fac. Pharm. Ankara*, 45(3), 652-673. .
- [14] Haque, S., Ahmad, F., Dar, S.A., Jawed, A., Mandal, R.K., Wahid, M., et al. 2018. Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat drug resistant bacteria. *Microb Pathog*, 121,293-302.
- [15] Kadiroğlu, P., Ekici, H., 2022. Prediction of Bioactive Properties of Walnut Green Husks Using FT-IR Spectroscopy. *Akademik Gıda*, 16(1), 20–26.
- [16] Sadeghi, M., Zolfaghari, B., Najafabadi, A.J., Abtahi, S.R. 2016. Anti-pseudomonas activity of essential oil, total extract, and proanthocyanidins of *Pinus eldarica* Medw. *Bark. Res Pharm Sci*, 11(1),58-64.
- [17] Zhang, H., Zou,P., Zhao, H., Qiu, J., Mac Regenstein, J., Yang, X. 2021. Isolation purification, structure and antioxidant activity of polysaccharidefrom pinecones of *Pinus koraiensis*, *Carbohydrate Polymers*, 251,117078.
- [18] Caponio, F., Gomes, T., Pasqualone, A. 2001. Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *European Food Research and Technology*, 212 (3), 329–333.
- [19] O'Toole, G.A. 2011. Microtiter dish Biofilm formation assay. *J Vis Exp*, 30(47),2437.
- [20] Ohman, D.E., Cryz, S.J., Iglewski, B.H. 1980. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol*,142(3),836–842.
- [21] Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., Crawford, I.P. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *J Bacteriol*, 172(2), 884–900.

- [22] Rashid, M.H., Rao, N.N., Kornberg, A. 2000. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J Bacteriol*,182(1): 225–227.
- [23] Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. 2006, Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 637–641.
- [24] Önem, E., 2022. New green solutions against bacterial resistance: palmarosa (*Cymbopogon martini*) essential oil and quorum sensing. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 25,100587.
- [25] Sharmin, S., Jahan, A.A., Kamal, S.M., Sarker, P. 2019. Fatal Infection Caused by *Chromobacterium violaceum*: A Case Report from a Tertiary Care Hospital in Bangladesh. *Case Reports in Infectious Diseases*, 4,6219295.
- [26] Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol*, 8 (9), 634–644.
- [27] Barros, D., Vieito, C., Santos, J., Ramos, C., Velho, M.V. 2020. Inhibitory Effects of *Pinus Pinaster Aiton* Subsp. *Atlantica* Bark Extracts Against Known Food Pathogens. *The Italian Association of Chemical Engineering*, 79, 163-168.
- [28] Bhattamisra, S.K., Kuean, C.H., Chieh, L.B., Yan, V.L.Y., Lee, C.K., Hooi, L.P., et al. 2018. Antibacterial activity of geraniol in combination with standard antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Nat Prod Commun*, 13 (7), 1934578X1801300701.
- [29] Pereira de Lira, M.H., Andrade Júnior, F.P., Moraes, G.Q., Macena, G.S., Pereira, F.O., Lima, I.O. 2020. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3),1-11.
- [30] Ilić, B.S., Kocić, B.D., Ćirić .V.M., Cvetković, O.G., Miladinović, D.L. 2014. An in vitro synergistic interaction of combinations of *thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol. *Sci World J*, 12, 826219.
- [31] Alvino Leite, M.C., Brito Bezerra, A.P., Sousa, C.P., Oliveira, L.E. 2015. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol*, 53(3),275-84.