

Laurus Nobilis, *Oregano* ve *Cinnamomum Zeylanicum* Uçucu Yağları İlaveli Antibakteriyel Selülozik Membranların Üretilmesi

Fabrication of *Laurus Nobilis*, *Oregano* and *Cinnamomum Zeylanicum* Essential Oils Supplemented Antibacterial Cellulosic Membranes

Yaşar Andelib AYDIN¹ 

¹ Marmara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Öz

Bu çalışmada, *Laurus nobilis*, *Oregano* ve *Cinnamomum zeylanicum* bitkilerinden hidrodistilasyon yoluyla elde edilen uçucu yağlar kullanılarak *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz (BC) membranlara antimikrobiyel özellik kazandırılması hedeflenmiştir. Uçucu yağların analizi gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda *L. nobilis*, *Oregano* ve *C. zeylanicum* uçucu yağlarının temel bileşenleri sırasıyla, 1,8-cineole (%63,7), carvacrol (%64,5) ve cinnamaldehyde (%80,9) olarak belirlenmiştir. BC membranlar, %1-12 (v/v) uçucu yağ içeren çözeltiler ile temas ettirilmiş ve daha sonra disk difüzyon tekniği ile *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Gram pozitif) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, Gram negatif) bakterilerine karşı etkinlikleri araştırılmıştır. Sonuçlar, *L. nobilis* uçucu yağı yüklenmiş BC membranların *S. aureus*'a karşı etkin olmadığını, *P. aeruginosa*'ya karşı ise ancak %8'in üzerindeki derişimlerde zayıf etki göstererek yarıçapı 2 mm'ye varan inhibisyon bölgeleri oluşturabildiğini göstermiştir. Öte yandan, *Oregano* ve *C. zeylanicum* uçucu yağları ile yüklenmiş biyofilmler yarıçapı sırasıyla 13 mm ve 16 mm'ye varan inhibisyon bölgeleri oluşturarak her iki patojene karşı da yüksek etkinlik göstermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel selüloz, antibakteriyel özellik, *Laurus nobilis*, *Oregano*, *Cinnamomum zeylanicum*.

Abstract

In this study, it was aimed to gain antimicrobial property in to bacterial cellulose (BC) membranes synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) using essential oils derived from *Laurus nobilis*, *Oregano* and *Cinnamomum zeylanicum* plants via hydrodistillation. The analysis of essential oils was realized by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS). Accordingly, major constituents of essential oils were identified as 1,8-cineole (63,7%), carvacrol (64,5%) and cinnamaldehyde (80,9%) for *L. nobilis*, *Oregano* and *C. zeylanicum*, respectively. BC membranes were contacted with solutions of 1-12% (v/v) oil content and then tested for antibacterial activity against *Staphylococcus auerus* (ATCC 25923, Gram positive) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, Gram negative) by disc diffusion technique. Results showed that BCs treated with the essential oil from *L. nobilis* were inactive against *S. aureus* and slightly active against *P. aeruginosa* only over concentrations of 8% with maximum inhibition radius of 2 mm. On the contrary, biofilms loaded with essential oils of *Oregano* and *C. zeylanicum* were highly active against both pathogens with inhibition zone reaching as high as 13 and 16 mm, respectively.

Keywords: Bacterial cellulose, antibacterial property, *Laurus nobilis*, *Oregano*, *Cinnamomum zeylanicum*.

I. GİRİŞ

Bitkisel kaynaklı selüloz ile aynı kimyasal yapıyı paylaşan bakteriyel selüloz, başlıcaları *Acetobacteraceae* ailesine ait olmak üzere bazı bakteriler, mantarlar, algler ve bir deniz canlısı türü olan tulumlular tarafından sentezlenebilmektedir [1-2]. Bu yolla sentezlenen selüloz, bitkisel selüloza kıyasla üstün saflık, kristalinite, mekanik dayanıklılık, su tutma kapasitesi ve biyoyoumluluk özelliklerine sahiptir. Bu nedenle, bakteriyel selüloz ve kompozitlerinin ilaç, sağlık ve malzeme bilimi

alanlarında kullanımı araştırılmaktadır [1]. Günümüze değin önerilen ticari uygulamalar arasında yapay kan damarı, doku ve cilt takviyesi, yara örtüsü, akustik diyafram ve elektronik kağıt yer almaktadır [3].

Çeşitli araştırmalar, bakteriyel selülozun yara örtüsü olarak kullanıldığında yüksek geçirgenliği ve nemli ortam sağlaması sayesinde iyileşmeyi hızlandırdığını kanıtlamıştır [1]. Ancak bu malzeme antimikrobiyel olmadığından, yara enfeksiyonunu engellemek için uygun stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir. Literatürde, gümüş nanoparçacıklarının emdirilmesi [4], gümüş veya kitosan ile kompozitlenmesi [5], benzalkonyum çözeltilisi [6] veya antibiyotik çözeltileri [7] ile muamele edilmesi gibi işlemler sonucunda *S. aureus* (gram pozitif) ve *E. coli* (gram negatif) model bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite elde edilmiştir.

Çoğunlukla gıda endüstrisinde kullanım alanı bulan bitkisel ekstraktlar ve uçucu yağlar fenolik bileşiklerce zengin olup, antifungal, antimikrobiyel ve antioksidan aktivite gibi biyolojik etkinliklere sahiptirler [8,9]. Uçucu yağların temel kaynağı tıbbi ve aromatik bitkilerdir. Uçucu yağ eldesinde en sık değerlendirilen bitkiler arasında lavanta, fesleğen, karanfil, biberiye, defne ve tarçın yer almaktadır. *Laurus nobilis* (Akdeniz defnesi) güney Akdeniz sahasına özgü, yüksekliği 8-10 m'ye erişebilen, sürekli yeşil kalan ağaçsı bir çalı olup, yaprak ve meyveleri uçucu yağ eldesinde kullanılabilir [10-11]. Yapraklarındaki uçucu yağ içeriği %1-3 aralığındadır ve ana bileşeni 1,8-cineole'dur. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden derlenen *L. nobilis* uçucu yağlarının %50-69 arasında 1,8 cineole içerdiği bildirilmiştir [8,11-12]. *Cinnamomum zeylanicum* (Seylan tarçını) ise güneydoğu Asya'da yaygın olarak yetişen defnegiller familyasından bir bitkidir. *C. zeylanicum*'un kökleri, yaprakları ve kabukları uçucu yağ eldesinde kullanılabilir. Uçucu yağın ana bileşeni kaynağına bağlı olarak cinnamaldehyde (kabuk), eugenol (yaprak) veya camphor (kök) olabilir [13]. Çeşitli çalışmalarda, *C. zeylanicum*'un %1-1,5 aralığında uçucu yağ içerdiği ve cinnamaldehyde oranının %53-80 aralığında olduğu saptanmıştır [14-16]. *Oregano* (kekik) ise ballıbabagiller familyasına mensup bir bitki olup, Akdeniz ülkelerinde yaygındır ve Türkiye florasında, 15'i endemik olmak üzere, 23 türü bulunmaktadır [17-18]. Bu türlerin yağ içerikleri %2'nin üzerindedir ve uçucu yağlarının ana bileşenleri carvacrol/thymol, g-terpinene ve p-cymene olarak bilinmektedir [8,17]. Bitki uçucu yağlarının bileşimlerinin ve antimikrobiyel etkinliklerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma bulunmasına rağmen [8,14-19], literatürde bakteriyel selüloz membranlara antibakteriyel özellik kazandırmaya yönelik bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, çürük erikten izole edilen ve *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) olarak adlandırılan suş kullanılarak sentezlenen bakteriyel selüloz membranlar, *L. nobilis*, *Oregano* ve *C. zeylanicum* bitkilerinden ekstrakte edilen uçucu yağlar ile muamele edilmiştir. Nihai malzemenin yara örtüsü olarak kullanımı hedeflendiğinden, yaralar üzerinde sıklıkla gelişebilen gram negatif (*P. aeruginosa*) ve gram pozitif (*S. aureus*) patojen bakteriler model olarak seçilmiş ve membranların antibakteriyel etkinlikleri araştırılmıştır.

II. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Mikroorganizmalar ve Kültür Koşulları

Selülozik membranların sentezinde çürük erikten izole edilen ve daha önce *Gluconacetobacter hansenii* P2A (KUEN 1606) olarak tanımlanan suş kullanılmıştır [2]. – 20°C'de gliserolde muhafaza edilen stok kültür Hestrin Schramm (HS) besiyerinde (%2 D-glukoz, %0,5 pepton, %0,5 maya özütü, %0,27 Na₂HPO₄, %0,115 sitrik asit, pH 5,0) [20], 28°C'de 3 gün inkübe edilerek canlandırılmış ve HS agar (%1,5 agar) içeren plakalarda muhafaza edilmiştir. Aşı kültürü, uygun morfolojideki bir koloninin 10 mL HS besiyerinde 30°C'de 48 saatlik inkübasyonu ile elde edilmiştir.

S. aureus (ATCC 25923) ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından liyofilize halde temin edilmiş, nutrient besiyerinde (Merck 1.05443) 37 °C'de 48 saatlik inkübasyon ile canlandırılmış ve nutrient agarda muhafaza edilmiştir.

2.2. Bakteriyel Selüloz Membranların Sentezi

Membran sentezinde Hestrin Schramm besiyeri kullanılmıştır. %10 aşı oranı kullanılarak, 28°C'de 5 gün sürdürülen statik inkübasyonun neticesinde besiyeri yüzeyinde sentezlenen biyofilm, distile su ile yıkanmış, 0,1N NaOH çözeltisi içerisinde kaynatılarak hücre ve besiyeri artıklarından arındırılmıştır. Nötralizasyon işlemi 0,1N CH₃COOH çözeltisinde 15 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Son olarak, distile su ile yıkanan biyofilmlerden 1,5 cm çapında dairesel kesitler çıkarılmış ve dondurularak (-80°C) kurutulmuştur.

2.3. Şişme Testi

Kuru ağırlıkları tespit edilen 1,5 cm çapındaki selülozik membranlar, oda sıcaklığında 25 mL ultra saf su, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, Sigma Aldrich) veya farklı derişimlerdeki (%1-12 v/v) *Oregano*, *L. nobilis* ve *C. zeylanicum* uçucu yağ çözeltileri içerisinde bekletilmiştir. Süre sonunda sıvı ortamdan uzaklaştırılan biyofilmlerin üzerindeki fazla

su/çözelti uzaklaştırılmış ve ağırlıkları ölçülmüştür. Deneyler üç tekrar ile gerçekleştirilmiş; şişme oranı 1 no'lu eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı} = \frac{(W_s - W_i)}{W_i} \quad (1)$$

Burada W_i kuru membran ağırlığını, W_s ise su veya çözelti ile doyurulmuş membran ağırlığını ifade etmektedir.

2.4. Uçucu Yağ Eldesi

Deneylerde kullanılan bitkiler yerel aktarlardan kurutulmuş olarak temin edilmiştir. Çalışmada, *L. nobilis* bitkisinin yaprakları, *Oregano* bitkisinin yaprak ve dal kısımları, *C. zeylanicum*'un ise kabukları kullanılmıştır. *L. nobilis* ve *Oregano*'nun 10 mesh, *C. zeylanicum*'un ise 100 mesh inceliğinde öğütülmesi ardından gerçekleştirilen hidrodistilasyon işlemi, Clevenger cihazı ile yapılmış olup, 1/5 katı sıvı oranı ve 4 saatlik kaynatma koşullarında yürütülmüştür. Elde edilen ekstraktlar susuz Na_2SO_4 ile kurutulmuş ve kullanılabilecek kahverengi cam şişede 4°C 'de muhafaza edilmiştir [15,19]. Uçucu yağların niteliksel ve niceliksel analizi TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsünde Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ bileşimi pik alanının tüm pik alanına oranlanması ile hesaplanmıştır.

2.5. Antibakteriyel Etkinin Belirlenmesi

Uçucu yağların antibakteriyel etkisinin belirlenebilmesi için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır [4]. Buna göre, 1,5 cm çapındaki selülozik biyofilmler, uçucu yağların etanol içerisindeki %1-12 (v/v) aralığında değişen derişimde çözeltileri ile 10 mg biyofilm/1 ml çözelti oranına uygun olarak 1 saat süre ile temas ettirilmiştir. Biyofilmler, yüzeylerindeki fazla çözeltinin uzaklaştırılması amacıyla yaklaşık 10 s bekletildikten sonra deneylerde kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak aynı işlem koşullarında sadece etanol emdirilmiş diskler kullanılmıştır.

S. aureus ve *P. aeruginosa* nutrient besiyerinde (NB) mililitre başına 10^5 koloni oluşturan birim (kob/ml) yoğunluğuna ulaşana değin geliştirildikten sonra, NB agar içeren petri kaplarına $100\ \mu\text{L}$ olarak yayılmıştır. Petri kabına, uçucu yağ çözeltileri ve etanol emdirilen diskler yerleştirildikten sonra, yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 37°C 'de 24h inkübe edilmiştir. Süre sonunda diskler etrafında inhibisyon bölgesi oluşumu gözlemlenmiş ve inhibisyon bölgesinin çapı ölçülmüştür. Tüm deneyler üç tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Uçucu Yağ Bileşimleri

Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, tür, bölge, mevsim, ekstraksiyon ve analiz yöntemi gibi etkenlere bağlı olarak değişen bileşimde, çoğunluğu düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonlardan oluşan birçok bileşik içerir [15]. Bu çalışmada değerlendirilen *L. nobilis*, *Oregano* ve *C. zeylanicum* bitkilerinden ekstrakte edilen uçucu yağların GC-MS ile belirlenen bileşimi Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. *L. nobilis*, *Oregano* ve *C. zeylanicum* uçucu yağlarının bileşimi.

Uçucu Yağ	Ana Bileşenler (%)
<i>L. nobilis</i>	1,8-cineole (63.7), sabinene (14.03), α -terpinylacetate (7.15), α -pinene (7.14), terpinen-4-ol (2.15), linalool (1.54), α -terpineol (0.71), α -myrcene (0.64), L-linalool (0.66), α -thujene (0.47), camphene (0.35)
<i>Oregano</i>	Carvacrol (64.5), p-cymene (12.93), γ -terpinene (8.6), caryophyllene (3.45), borneol (2.29), β -myrcene (2.25), α -terpinene (1.8), α -pinene (1.12), linalool (0.74), α -thujene (0.63), caryophyllene oxide (0.62), camphene (0.4), α -bisabolene (0.26)
<i>C. zeylanicum</i>	Trans-cinnamaldehyde (80.9), cis-cinnamaldehyde (10.8), benzaldehyde (3.7), cinnamic acid (0.43)

L. nobilis uçucu yağının ana bileşeni 1,8-cineole olarak bilinmekte ve tipik olarak %45-60 aralığında bulunması beklenmektedir. Diğer bileşenler ise %12-15 diğer terpenler, %3-4 sesquiterpenler, %3 methyleugenol ve <%3 α ve β -pinene, phellandrene, linalool, geraniol ve terpineol olarak sıralanmaktadır [21]. Bu çalışmada elde edilen *L. nobilis* uçucu yağında tespit edilen 1,8-cineole miktarı belirtilen aralığın üzerinde olmakla beraber, Hatay [8,11] ve Antalya [19] yörelerinden derlenen *L. nobilis* uçucu yağlarının da benzer şekilde %60'ın üzerinde 1,8-cineole içerdikleri bildirilmiştir.

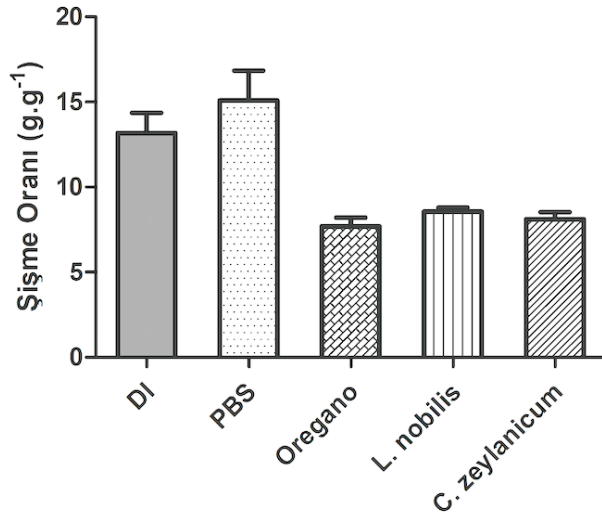
Çalışmada elde edilen *Oregano* uçucu yağının ana bileşeni thymol izomeri olan carvacrol olarak belirlenirken, monoterpen hidrokarbonlar p-cymene ve γ -terpinene'in de yüksek miktarlarda yer aldığı saptanmıştır. Sonuçlar, Dadoğlu ve Evrendilek tarafından Isparta bölgesinden derlenen *O. minutiflorum* uçucu yağı ile yüksek benzerlik göstermektedir [8].

C. zeylanicum çubuklarından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri trans-cinnamaldehyde (%60-80) ve eugenol (%2) olarak bilinmektedir [22]. Cis-cinnamaldehyde içeriği ise çeşitli çalışmalarda, %0,2-2,3 aralığında bulunmuştur [15-16, 22]. Çalışmada elde edilen *C. zeylanicum* uçucu yağında

eugenol saptanmamışsa da, her iki izomer de dikkate alındığında oldukça yüksek cinnamaldehyde içerdiği belirlenmiştir.

3.2. Şişme Testi

Yara örtüsü olarak kullanılacak malzemelerin yüksek su tutma kapasitesine sahip olmaları yara iyileşmesini hızlandırması sebebiyle aranan bir nitelikler [6]. Bakteriyel selüloz membranlar fibril çapı ve yoğunluğuna bağlı olarak ağırlığının 170 katına kadar su tutabilmektedirler [23]. Yüksek şişme kapasitesi sayesinde BC membranların uçucu yağ çözeltilerini de yüksek bir oranla absorplayabilecekleri öngörülmüştür. Bununla beraber, sentezlenen BC membranların şişme kapasitesinin bir ölçüsü olarak şişme oranları belirlenmiştir. Deiyonize su, PBS ve uçucu yağ çözeltilerinde gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 1’de sunulmuştur.



Şekil 1. Bakteriyel selüloz membranların deiyonize su, fosfat tampon çözeltisi ve uçucu yağ çözeltileri içerisindeki şişme dereceleri.

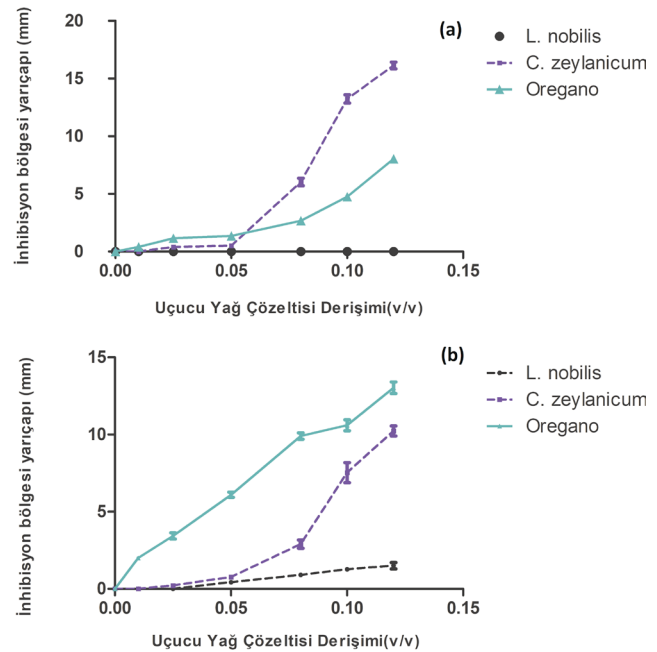
Değerlendirmeler sonucunda bakteriyel selüloz membranların şişme dereceleri deiyonize su ortamında $13,18 \pm 1,62$ g.g⁻¹, PBS ortamında ise $15,07 \pm 2,49$ g.g⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Bu durum, çalışma kapsamında elde edilen bakteriyel selüloz membranların kendi ağırlıklarının en az 13 katı oranında su absorplayabildiklerini göstermekte ve yara örtüsü olarak kullanımlarının elverişli olduğuna işaret etmektedir. Öte yandan, uçucu yağ çözeltileri ile temas ettirilen membranlar daha düşük şişme dereceleri göstermişlerdir. Şişme dereceleri *Oregano*, *L. nobilis* ve *C. zeylanicum* uçucu yağ çözeltileri ortamında sırasıyla $7,70 \pm 0,52$ g.g⁻¹, $8,56 \pm 0,23$ g.g⁻¹ ve $8,1 \pm 0,43$ g.g⁻¹ olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, uçucu yağ çözeltisi bileşimi ile şişme derecesi arasında anlamlı bir

ilişki bulunmadığını gösterdiğinden, düşük şişme derecesinin yağ derişiminden ziyade çözücü olan etanolden ileri geldiği anlaşılmıştır.

Bakteriyel selüloz membranların yüksek su tutma kapasitesi, hidrofilik karakterin yanı sıra, 3 boyutlu ağ yapısı sayesinde oluşan çok gözenekli yapının doğurduğu kapiler kuvvetler ile ilişkilendirilmektedir [24]. Bu nedenle sentezlenen BC membranların fibril yapısı, kristalinitesi ve kimyasal yapısı şişme derecesi üzerinde etkilidir. *G. hansenii* P2A (KUEN 1606) tarafından statik koşullar altında sentezlenen BC membranların yapısal özellikleri önceki çalışmalarda XRD, FTIR, TGA ve SEM analizleri ile ortaya konmuştur. Buna göre, BC membranlar 8–10 nm kalınlığında fibrillerden oluşan düzenli bir ağ yapısına sahiptir. Kristal ve kimyasal yapısı Selüloz I morfolojisine uyum gösteren BC membranların bağıl kristalinite endeksi %78,7 olarak hesaplanmış, maksimum bozunma sıcaklığı 313,3°C olarak belirlenmiştir [3].

3.3. Antibakteriyel Etki

Çalışmada sentezlenen selülozik biyofilmler uçucu yağların etanol içerisindeki %1, %2,5, %5, %8, %10 ve %12’lik (v/v) çözeltileri ile temas ettirilmiş ve disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2a-d’de sunulmuştur.



Şekil 2. Uçucu yağ çözeltisi derişiminin selülozik biyofilmlerin antibakteriyel aktivitesine etkisi ve (a) *S. aureus*, (b) *P. aeruginosa*. *Oregano* uçucu yağı ile işlem gören BC membranların inhibisyon bölgeleri (c) *S. aureus*, (d) *P. aeruginosa*.

Şekil 2.c-d’de ortaya konulduğu gibi, uçucu yağlar ile işlem görmemiş selülozik biyofilmler etrafında inhibisyon bölgesi gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, antibakteriyel etkinliğin uçucu yağlar ile sağlandığı açıktır. Uçucu yağlarda bulunan alkaloid, flavanoid, isoflavone, monoterpene, fenolik asit, carotenoid vb. fitokimyasallar antimikrobiyel etki gösterebilirler. Bunlar arasında en etkili olanları, çoğunluğu fenolik bileşikler olan, thymol, carvacrol, p-cymene, γ – terpinene, 1,8-cineole, linalool, limonene, α -bisabolol, eugenol ve cinnamaldehyde olarak sıralanabilir [21,25]. Esansiyel yağlarda bulununan bu etken maddelerin bakterilerin hücre zarlarındaki yağ dokusunu bozarak hücre geçirgenliğini artırdığı ve içerik kaybına yol açarak hücre ölümünü tetiklediği birçok çalışma ile ispatlanmıştır [21,26].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *L. nobilis* uçucu yağı içeren selülozik biyofilmlerin, yüksek oranda 1,8-cineole içeriğine rağmen, gram pozitif model bakteri üzerinde etkisiz olduğunu, gram negatif model bakteri için ise, düşük antibakteriyel aktivite sergilediğini göstermiştir. Literatür verileri, *L. nobilis* uçucu yağının her iki türe karşı da etkin olduğunu gösterdiğinden [21], biyofilmin yeterli düzeyde etken madde içermediği sonucuna varılmıştır.

Öte yandan, *C. zeylanicum* ve *Oregano* uçucu yağları ile muamele edilen bakteriyel selülozik biyofilmler gerek *S. aureus*, gerekse *P. aeruginosa* üzerinde yüksek aktivite göstererek yarıçapı 16 ve 13 mm’ye varan inhibisyon bölgeleri oluşturmuşlardır. *C. zeylanicum* uçucu yağı *S. aureus* üzerinde daha etkili olurken, *Oregano* uçucu yağı ise *P. aeruginosa*’ya karşı daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. *Oregano* uçucu yağı çözeltileri en düşük derişim olan %1 (v/v)’de dahi bakterisidal etkinliğe sahip iken, *C. zeylanicum* uçucu yağı çözeltileri için %2.5 (v/v) ve üzerindeki derişimlerde etkinlik gözlemlenebilmiştir. Bu değerler, BC membranların ortalama şişme dereceleri ve kuru ağırlıkları göz önüne alınarak ağırlık oranına dönüştürüldüğünde, *Oregano* uçucu yağı için %3,98, *C. zeylanicum* uçucu yağı için ise %10,51 olarak hesaplanmıştır. Lopez ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada polipropilen ve polietilen/etilen vinil alkol kopolimeri yapısındaki filmlere *C. zeylanicum* ve *Origanum vulgare* uçucu yağları katılarak antimikrobiyel etkinlikleri ölçülmüş ve Gram pozitif bakteriler için %8-10, Gram negatif bakteriler için ise daha yüksek derişimlerin gerekli olduğu bildirilmiştir [27]. Bu çalışmada elde edilen sonuçların daha üstün olması, BC membranın mikrofibrillerden oluşan gözenekli ağ yapısı ile ilişkilendirilebilir. Bu yapısı sayesinde etken maddelerin daha yüksek hızda difüzyonu sağlanması olasıdır. Tespit edilen inhibisyon yarıçapları literatürde bakteriyel selülozik biyofilmlere antimikrobiyel özellik kazandırılması için önerilen metodlar ile kıyaslanmış ve sonuçlar Tablo 2’de derlenmiştir.

Tablo 2. Bakteriyel selüloz membranlara antibakteriyel özellik kazandırılmasında uygulanan yöntemlerin kıyaslanması.

Yöntem	Bakteri	İnhibisyon Bölgesi Yarıçapı (mm)	Kaynak
Gümüş Emdirilmesi	<i>E.coli</i> * <i>S. aureus</i> *	2 3.5	[4]
Gümüş Emdirilmesi	<i>E.coli</i> (ATCC 25922) <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	12.5 6.5	[5]
Gümüş Emdirilmesi	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	20	[24]
Benzalkonyum Çözeltisi ile İşlem	<i>E.coli</i> (CGMCC 1.1100) <i>S. aureus</i> (CGMCC 1.128) <i>B. subtilis</i> (CGMCC 1.1630)	5 8.5 14.5	[6]
Uçucu Yağlar ile İşlem	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>S.aureus</i> (ATCC 25923)	13 16	Bu çalışma

*Suş bildirilmemiştir.

Tablo 2’de yer alan veriler dikkate alındığında uçucu yağların alternatif yöntemlere kıyasla oldukça yüksek antibakteriyel etkinlik sağladığı sonucuna ulaşılmaktadır. Gümüş emdirilmiş biyofilmlerde yara dokusu içerisine gümüş iyonlarının salınımı söz konusu olmaktadır. Dolayısıyla, gümüş iyonlarının yüksek derişimde olması halinde canlı dokunun zarar görme olasılığı da bulunmaktadır [4]. Bu çalışmada önerilen yöntemin diğer bir avantajı, kullanılan antibakteriyel ajanların biyoyoumlu olması ve dolayısıyla ciltte yan etki oluşma ihtimalini ortadan kaldırmasıdır. Ayrıca, uçucu yağların hidrofobisiteyi arttırması sayesinde, yara bölgesine yapışma oranının da düşeceği öngörülebilir.

Bu nedenle, önerilen yöntemin uçucu yağların yüksek verim ve etkinlik ile elde edilmesini sağlayacak doğrultuda optimize edilmesi ve etki sürelerinin arttırılmasına yönelik olarak geliştirilmesi neticesinde, yara örtüsü olarak kullanıma uygun antibakteriyel özellikli bakteriyel selüloz membranların üretimi için en uygun yöntem olacağı düşünülmektedir.

IV. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRMELER

Bu çalışmada bakteriyel selülozik membranlara antibakteriyel özellik kazandırılması için en etkili yöntem olarak önerilen gümüş nanoparçacıkları ile yüklenmesi/kompozitlenmesine alternatif bir yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla *L. nobilis*, *Oregano* ve *C. zeylanicum* bitkilerinden hidrodistilasyon işlemi ile elde edilen uçucu yağlar kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *Oregano* ve *C. zeylanicum* uçucu yağları ile işlem gören selülozik biyofilmler, yara dokusunda sıklıkla gelişebilen *S. aureus* ve *P. aeruginosa* model bakterilerine karşı yüksek derecede antibakteriyel etkinlik göstermiş ancak, *L. nobilis* uçucu yağı ile işlem gören selülozik biyofilmler için yalnızca *P. aeruginosa*’ya karşı sırlı antibakteriyel etkinlik elde edilebilmiştir. Sonuçların

geliştirilmesi için, devam eden çalışmalarda temas süresinin uzatılması ya da çapraz bağlayıcı kullanılması gibi stratejilerin, antibakteriyel özelliğin elde edilmesi ve etki süresi üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Petersen, N., & Gatenholm, N., (2011). Bacterial Cellulose-Based Materials and Medical Devices: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 1277-1286.
- [2] Vazquez, A., Foresti, M.L., Cerrutti, P., & Galvagno M., (2013). Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545-554.
- [3] Aydın, Y.A., & Deveci Aksoy, N., (2014). Isolation and Characterization of an Efficient Bacterial Cellulose Producer Strain in Agitated Culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1065-1075.
- [4] Maneerung, T., Tokura, S., & Rujiravanit, R., (2008). Impregnation of Silver Nanoparticles into Bacterial Cellulose for Antimicrobial Wound Dressing. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 43-51.
- [5] Li, S.M., Jia, N., Ma, M.G., Zhang, Z., Liu, Q.H., & Sun, R.C., (2011). Cellulose-silver Nanocomposites: Microwave-assisted Synthesis, Characterization, Their Thermal Stability, and Antimicrobial Property. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 441-447.
- [6] Wei, B., Yang, G., & Hong, F., (2011). Preparation and Evaluation of a Kind of Bacterial Cellulose Dry Films with Antibacterial Properties. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 533-538.
- [7] Gromovykh T.I., Sadykova, V.S., Lutchenko, S.V., Dmitrenok, A.S., Feldman, N.B., Danilchuk, T.N., & Kashirin, V.V., (2017). Bacterial Cellulose Synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for Medical Applications. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 60-67.
- [8] Dadaloğlu, I., & Evrendilek, G.A., (2004). Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish *Oregano* (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8255-8260.
- [9] Sukhtezari, S., Almasi, H., Pirsai, S., Zandi, M., & Pirouzifard M.K., (2017). Development of Bacterial Cellulose Based Slow-release Active Films by Incorporation of *Scrophularia striata* Boiss. extract. *Carbohydrate Polymers*, 156, 340-350.
- [10] Kıvrak, Ş., Göktürk, T., & Kıvrak, İ., (2017). Assessment of Volatile Oil Composition, Phenolics and Antioxidant Activity of Bay (*Laurus nobilis*) Leaf and Usage in Cosmetic Applications. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(2), 148-161.
- [11] Özcan, M., & Chalchat, J.-C., (2005). Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (*L. nobilis* L.) Leaves Growing in Turkey. *Journal of Medicinal Food*. 8(3), 408-411.
- [12] Sangun, M.K., Aydın, E., Timur, M., Karadeniz, H., Caliskan, M., & Aydın, O., (2007). Comparison of Chemical Composition of the Essential Oil of *Laurus nobilis* L. Leaves and Fruits from Different Regions of Hatay, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 28(4) 731-733.
- [13] Kazemi, M., & Mokhtariniya, S., (2016). Essential Oil Composition of Bark of *Cinnamomum zeylanicum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(3), 786-789.
- [14] Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G.V., Zeytinoglu H.S., & Vural, N., (2010). Composition, Antimicrobial Activity and in vitro Cytotoxicity of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3274-3280.
- [15] Li, Y.Q., Kong, D.X., & Wu, H. (2013). Analysis and Evaluation of Essential Oil Components of Cinnamon Barks using GC-MS and FTIR Spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 41, 269-278.
- [16] Jiang, Z., Jiang, H., & Xie, P. (2013). Antifungal Activities Against *Sclerotinia sclerotiorum* by *Cinnamomum cassia* Oil and Its Main Components. *Journal of Essential Oil Research*, 25(6), 444-451.
- [17] Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., & Karadoğan, T., (2004). Antibacterial Activity and Composition of Essential Oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with Commercial Importance in Turkey. *Food Control*, 15(3), 169-172.
- [18] Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Esdek, M., & Mete, E., (2008). Antifungal, Phytotoxic and Insecticidal Properties of Essential Oil Isolated from Turkish *Origanum acutidens* and Its Three Components, Carvacrol, Thymol and p-Cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), 8788-8795.
- [19] Müller-Riebau, F., Berger, B., & Yegen, O., (1995). Chemical Composition and Fungitoxic Properties to Phytopathogenic Fungi of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2262-2266.
- [20] Schramm, M., & Hestrin, S. (1954). Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. 1: Micromethod for the Determination of Celluloses. *Biochemical Journal*, 56(1), 163-166.
- [21] Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., & Yuk, H.G., (2014). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625-644.
- [22] Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., & Corke, H. (2007). Antibacterial Properties and Major Bioactive Components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity Against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5484-5490.
- [23] Khattak, W.A., Khan T., Ul-Islam M., Wahid F., & Park, J.K., (2015). Production, Characterization and Physico-Mechanical

- Properties of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(1), 45-53.
- [24] Barud, H.S., Regiani, T., Marques, R.F.C., Lustri, W.R., Mes-saddeq, Y., & Ribeiro, S.J.L., (2011). Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. *Journal of Nanomaterials*, <https://doi.org/10.1155/2011/721631>.
- [25] Walentowska, J., & Foksowicz-Flaczyk, J., (2013). Thyme Es-sential Oil for Antimicrobial Protection of Natural Textiles. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84, 407-411.
- [26] Peng, Y., & Li, Y., (2014). Combined Effects of Two Kinds of Essential Oils on Physical, Mechanical and Structural Pro-perties of Chitosan Films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
- [27] López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín C., (2007). De-velopment of Flexible Antimicrobial Films Using Essential Oils as Active Agents. *Journal of Agricultural and Food Che-mistry*, 55(21), 8814-8824.