



ORJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg

Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J

ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238

Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1071396>



Cinnamomum verum Uçucu Yağının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Üzerindeki Anti-biyofilm ve Anti-quarum Sensing Aktivitesi

Esin KIRAY ¹

¹Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

Geliş Tarihi / Received: 10.02.2022, **Kabul Tarihi / Accepted:** 20.06.2022

ÖZ

Amaç: Günümüzde mevcut kullanımdaki antimikrobialer üzerinde dirençli bakterilerinin sayısının artması halk sağlığı açısından büyük tehlike oluşturmaktadır. Çoklu ilaca dirençli patojenlerin ortaya çıkması, alternatif tedavi stratejilerinin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bitki uçucu yağları hastalıkların tedavisinde toksik olmayan, uygun maliyetli ve erişilebilir olması nedeni ile alternatif antimikrobialer olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, *Cinnamomum verum* yaprağı esansiyel yağının (EY) *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* üzerindeki antibakteriyel ve anti-biyofilm etkisi ile anti-quarum sensing (QS) özelliklerini değerlendirmek amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmada *C. verum* EY'nin *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* üzerindeki Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBC) ları belirlenmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MIC'ler) belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. *C. verum* EY'nin kimyasal içeriği, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak belirlenmiştir. **Bulgular:** *C. verum* EY test edilen suşlara karşı 0,5 ve 1,0 mg/mL oranlarında MIC ve MBC göstermiştir. *C. verum* EY'nin 2 mg/mL konsantrasyonda yüksek oranda anti-QS aktivite gösterdiği belirlenmiştir. GC-MS sonucuna göre *C. verum* yağında en bol bulunan bileşik sinnalaldehit olarak bulunmuştur. **Sonuç:** *C. verum* EY'nin bakteriyel biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı potansiyel kullanım alanı oluşturabilecek etkinliğe sahiptir. *C. verum* EY'lerin anti-QS aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlı olup, bu alanda daha çok patojen mikroorganizma üzerindeki anti-QS aktivitesi araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Tarçın, Uçucu yağ, Anti-biyofilm, Anti-quarum Sensing.

Anti-biofilm and Anti-quarum Sensing Activity of *Cinnamomum verum* Essential Oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*

ABSTRACT

Objective: The increase in the number of bacteria resistant to antimicrobials in current use poses a great danger to public health. The emergence of multi-drug-resistant pathogens on antimicrobials in current use has made it necessary to search for alternative treatment strategies. Plant essential oils are considered as alternative antimicrobials in the treatment of diseases because they are non-toxic, cost-effective and accessible. This study aimed to evaluate the antibacterial and antibiofilm effect and anti-quarum sensing (QS) properties of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Materials and Methods:** In the study, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of EO on *P. aeruginosa* and *A. baumannii* were determined. The microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs). The chemical content of *C. verum* EO was determined using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). **Results:** *C. verum* EO showed MIC and MBC at 0.5 and 1.0 mg/mL versus strains tested. It was determined that *C. verum* EO showed high anti-QS activity at a concentration of 2 mg/mL. According to GC-MS results, cinnamaldehyde was found to be the most abundant compound in *C. verum* EO. **Conclusion:** *C. verum* EO has potential to be used against infections caused by bacterial biofilms. Studies on the anti-QS activity of *C. verum* EOs are limited, and the anti-QS activity on pathogenic microorganisms should be investigated in this area.

Keywords: Cinnamon, Essential oil, Anti-biofilm, Anti-quarum Sensing.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author Esin KIRAY, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kırşehir, Türkiye.

E-mail: esin.kiray@ahievran.edu.tr

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Kıray, E. (2023). *Cinnamomum verum* uçucu yağının *pseudomonas aeruginosa* ve *acinetobacter baumannii* üzerindeki anti-biyofilm ve anti-quarum sensing aktivitesi. *BAUN Health Sci J*, 12(1): 169-176. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1071396>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Son yıllarda mevcut antimikrobiyal terapötiklerin düzensiz ve keyfi kullanımı dirençli bakteri sayısının artmasına sebep olmuş ve bu durum küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Wijesinghe, 2021). Dirençli bakteri sayısındaki artış, dünya çapında mortalite oranlarının artmasına, tedavi maliyetinin ve hastanede kalış süresinin uzamasına sebep olmuştur. Biyofilm oluşumu, bakterilerin bu tür bir direnç geliştirme mekanizmalarından biri olup, mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeyler üzerinde ürettikleri polimerik malzeme içinde korunmalarını sağlayan yapılardır (Theodora, 2019). Biyofilmler, çeşitli mekanizmalar kullanarak antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedirler (Wijesinghe, 2021). Biyofilmler ayrıca harici bir fiziksel bariyer görevi görmekte ve antibiyotiklerin geçirgenliğini de bu şekilde azaltmaktadırlar (Sharma, 2019).

İnsan mikrobiyal enfeksiyonlarının çoğu biyofilm enfeksiyonlarıdır ve biyofilmlerin dirençli doğası biyofilmlerin tedavisini ve yok edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, yüksek etkinliğe sahip yeni etkili anti-biyofilm ajanların belirlenmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel antimikrobiyaller, klinik ortamda mikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesi, tedavisi ve kontrolünde potansiyel bir alternatif olarak görülmektedir ancak yüksek terapötik etkinlik ve düşük toksisiteye sahip etkili bileşiklerin belirlenmesi için yoğun çalışmalar yapılmalıdır (Wijesinghe, 2021). Bazı patojenik bakteriler biyofilm oluşumu sırasında Quorum Sensing (QS) adı verilen bir mekanizma kullanmaktadırlar. QS, otoindüktörler olarak adlandırılan hücre dışı sinyalleme molekülleri tarafından bakteriler arasındaki haberleşmeyi sağlayan bir iletişim şeklidir. Bakteriler bu sinyal molekülleri aracılığıyla virülans faktörlerinin ekspresyonunu, sekonder metabolit ürünlerinin üretimini, biyofilm oluşumunu ve konakçı ile diğer mikroorganizmalar arasındaki iletişimi düzenlemektedir (Barzegari, 2020). Ayrıca virülans faktörleri dezenfektan toleransı, spor oluşumu, toksin üretimi ve mobilitenin düzenlenmesi gibi hücrenel süreçlerde de etkilidir (Zhao, 2020). QS inhibitörlerinin, biyofilm oluşumunu, bakteriyel direnci ve virülans genlerinin ekspresyonunu engellediği düşünüldüğünde, bu inhibitörlerin bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmede umut verici yeni bir antibakteriyel strateji olduğu görülmektedir (Kıray, 2021).

Acinetobacter baumannii ve *Pseudomonas aeruginosa*, hastane enfeksiyonu etkeni olarak en sık karşılaşılan mikroorganizmalar arasındadır. Bu bakteriler dış ortam şartlarına dayanıklı olmaları nedeniyle hastane ortamında uzun süre canlılıklarını koruyabilmektedir (Uğur, 2019). *A. baumannii* tedavisi zor enfeksiyonun en yaygın nedenlerinden biri olup, giderek artan çoklu ilaç direncine sahip bir mikroorganizmadır. Giderek artan ilaç direnci

nedeniyle tedavi açısından ciddi sorunlara yol açmaktadır. Toplum kökenli enfeksiyonlarda da karşımıza çıkabilen bu mikroorganizmalar sıklıkla hastanede yatan hastalarda pnömoni, yara yeri enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu, bakteriyemi ve menenjit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Uğur, 2019). *P. aeruginosa*, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda hastane enfeksiyonlarından, kistik fibrozlu hastalarda solunum yolu enfeksiyonlarından ve diyabetli hastalarda yara enfeksiyonlarından sorumlu olan hastane patojenlerinden biridir (Wijesinghe, 2018; Bassetti, 2018). *P. aeruginosa*'nın şiddeti, biyofilm oluşturma yeteneğiyle birlikte elastaz, piyosiyenin, eksotoksinler, alkalın proteaz, ramnolipidler ve sideroforlar gibi çeşitli virülans faktörlerinin üretimi ve salgılanmasından kaynaklanmaktadır. *P. aeruginosa*'da bu virülans faktörlerinin üretimi, QS sisteminin kontrolü altında bulunmaktadır (Alva, 2021). Yapılan çalışmalarda çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* ve *P. aeruginosa*'ya karşı anti-QS bileşiklerinin izolasyonu ile ilgili raporlar sınırlıdır. Yeni tedavilerin geliştirilmesi veya keşfi çok önemlidir (Sienkiewicz, 2014).

Cinnamomum verum / gerçek tarçın / Sri Lanka'nın yerli bir bitkisidir ve Sri Lanka, Hindistan ve Güney Amerika ülkeleri de dahil olmak üzere dünya çapında yaygın olarak kullanılan mutfak baharatlarından biridir (Jayaprakasha & Rao 2011). *C. verum* yapraklarından elde edilen yağların, anti-paraziter etki, kanser önleyici, antigliserik ve anti-lipemik etki, nörodejeneratif ve kardiyovasküler patolojilere karşı aktivite, tansiyon düzenleyici, antioksidan ve antiinflamatuvar etki gibi çeşitli tıbbi özellikler sergilediği gösterilmiştir (Rad, 2021; Haddi et al. 2017, Rao & Gan 2014). *C. verum* adına yapılan çalışmalarda çeşitli patojenler üzerindeki anti-biyofilm ve anti-QS etkilerine yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır.

Mevcut çalışma, bitkisel doğal ürün olan *C. verum* yaprağı esansiyel yağının antibakteriyel, anti-biyofilm ve anti-QS özelliklerinin *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* üzerindeki etkinliğini değerlendirmek amacıyla ile tasarlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları

Çalışmamızda kullanılan *P. aeruginosa* (ATCC 25619) ve *A. baumannii* (ATCC 17978) suşları Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Standart bakteri suş stokları, -80°C'de BHI (Brain Heart Infusion-Difco®) + gliserol (%20) tutulmuştur. Deneylerde kullanılmadan önce organizmalar, taze hazırlanmış TSB ortamında art arda iki defa aerobik şartlarda 37°C'de 24 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir.

Standart bakteri suşları, OD600 = 0.01 ($\sim 2 \times 10^6$ - kob/mL) karşılık gelen 0.5 McFarland ölçeği ile karşılaştırılarak bulanıklık ayarlanarak hazırlanmıştır.

C. verum uçucu yağ seyreltmelerinin hazırlanması

C. verum yaprağı EY, bu çalışma için Sri Lanka'dan (WCC/3569) satın alınmıştır (Romik Lanka Marketing Services). 2 mg/mL konsantrasyonda uçucu yağ elde etmek için Tween 80 (%0.05) solüsyonu ve BHI suyu içinde seyreltme işlemi yapılmıştır.

C. verum EY'nin antimikrobiyal etkinliği

Elde edilen saf uçucu yağ, *P. aeruginosa* (ATCC 25619) ve *A. baumannii* (ATCC 17978) suşlarına karşı agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. TSA üzerinde patojenik bakteriler geliştirilmiştir. Geliştirilen suşların 0,5 McFarland standart bulanıklığı steril tuzlu su çözeltisi ile ayarlanarak TSA üzerine homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Petrilerde açılan kuyucuklara 10 ve 20 mg/mL konsantrasyonda 100 µL tarçın uçucu yağı uygulanmıştır. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Çalışma üç kez tekrarlanmıştır (Tabbouche, 2017).

C. verum EY'nin minimum İnhibitör konsantrasyonu (MIC)

Tarçın uçucu yağının *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *A. baumannii* (ATCC 17978) üzerindeki MIC değerleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth mikrodilüsyon yönteminin değiştirilmiş bir standardı kullanılarak belirlenmiştir (Kaur et al., 2019). Tip suşlar TSB besiyerinde 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra (OD600) = 0.01 ($\sim 2 \times 10^6$ kob/mL) olacak şekilde TSB ile seyreltilmiştir. Tarçın EY'nin çalışma solüsyonu (2 mg/mL) 96 oyuklu steril düz tabanlı mikroplate plakasının ilk oyuğu sütununa ilave edilmiş ve seri EY seyreltmeleri gerçekleştirilmiştir (2 – 0.01 mg/mL). Daha sonra, 96 oyuklu plakaya 100 µL bakteri süspansiyonları ilave edildikten sonra 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Görünür bakteri üremesi olmayan minimum konsantrasyon MIC olarak tanımlanmıştır. EY içermeyen bakteri kültür ortamı negatif kontrol olarak kullanılırken, Klorheksidin diglukonat (CHL, Sigma-Aldrich, ABD) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Wijesinghe, 2021).

C. verum EY'nin minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC)

Minimum bakteri öldürücü konsantrasyon (MBC), mikroorganizmaların görsel büyümesinin gözlemlenmediği konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonlarından 10 µl'lik bir kısım geri çekilerek belirlenmiştir. TSA agar plakalarına aktarılan kültürler aerobik olarak 24 saat daha 37°C'de inkübe edilmiştir. Bakteri popülasyonunu tamamen öldürmek için gereken en düşük uçucu yağ konsantrasyonu (gece boyunca inkübasyondan sonra TSA yüzeyinde büyüme yok) MBC olarak tanımlanmıştır (Zhong, 2019; Firmino, 2018).

C. verum EY'nin anti-biyofilm aktivitesinin ölçümü

Anti-biyofilm testi için TSA'da tip suşlar geliştirildikten sonra, eşit oranlarda tarçın uçucu yağı ve bakteri kültürleri (OD 600 = 0.132) 96 oyuklu mikroplate plakalarına aktarılmış (100 µl) ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak MRS broth kullanılmıştır. Mikroplate tabanına yapışan hücreler iki kez yıkandıktan sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Biyofilmler 200 µL %0.4 (w/v) kristal viyole ile aseptik olmayan şartlarda 30 dakika boyanmıştır. Kuyular iki kez su ile durulandıktan sonra tekrar hava ile kurumaya bırakılmıştır. Çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Optik yoğunluk 595 nm'de ölçülmüştür. Kör olarak TSA ve kontrol olarak ekstraksız bakteri kültürleri kullanılmıştır. Yüzde biyofilm inhibisyonu aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Çalışma üç kez tekrarlanmıştır (Theodora, 2019).

Yüzde biyofilm inhibisyonu = (Control OD595- İşlem görmüş OD595)/ (Kontrol OD595) x 100

C. verum EY'nin Anti-QS aktivitesi

Tarçın EY'nin anti-QS aktivitesinin belirlenmesi için indikatör suş olarak *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 kullanılmıştır. Bakır kompleksinin ve liganının anti-QS aktivitesi, agar kuyu difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. *C. violaceum* TSB besiyerinde 28°C 48 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Geliştirilen kültürler daha sonra drigalski spatula ile TSA besiyeri üzerine yayıldıktan sonra plaklara 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Ardından kuyucuklara 2 mg/mL (100 µL) konsantrasyonunda tarçın EY uygulanmıştır. Plakalar 28°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra tarçın EY'nin anti-QS aktivitesi, violacein pigmentinin arka planına karşı bulanık bir zon bölgesi oluşturması açısından değerlendirilmiştir. Çalışma üç kez tekrarlanmıştır (Abudoleh, 2017).

C. verum kimyasal bileşiminin belirlenmesi

C. verum EY'nin kimyasal analizi Shimadzu GC-MS-138 QP2010S'de gaz kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney koşulları aşağıdaki gibidir (Wijesinghe ve ark. 2020). Kapiler Kolon: 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Çalışma sıcaklıkları: enjektör (250 °C), dedektör (250°C), kolon (60°C), 2°C/dk, 240°C; İyonizasyon voltajı: 70 eV; ve taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 µl ve tarama 45-450 amu (m/z) aralığında gerçekleşmiştir. Toplam çalışma süresi 40 dakikaya ayarlanmıştır. Analitleri tanımlamak için NIST-11 (Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü, Gaithersburg, ABD) kütle spektral veri tabanı ve NIST kütle spektral arama programı (Sürüm 2.0g) kullanılmıştır (Alva, 2021).

İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi GraphPad® programı, San Diego California, ABD, sürüm 5.0 ile yapılmıştır. Kullanılan istatistiksel test, çoklu karşılaştırmalar için ANOVA testi ve bunu Bonferroni testi izlemiştir. Analizlerde p <0,01 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve

bir yıldızla gösterilmiştir. MIC sonuçlarının belirlenmesi, biyofilm ölçümü, CBM testleri ve CFU sayımları, üç kopya kullanılarak yapılmıştır. Tüm testler üç bağımsız deneyde yapılmıştır.

Araştırmanın etik yönü

Bu çalışma kapsamında etik kurul onayının alınmasına gerek yoktur.

BULGULAR

C. verum EY'nin antimikrobiyal aktivite testi

Cinnamomum verum bitkisinden elde edilen EY *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *A. baumannii* (ATCC 17978) üzerindeki antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi uçucu yağın her iki patojen mikroorganizma üzerinde güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 1. *C. verum* EY'nin test bakterileri üzerindeki MIC ve MBC değerleri.

	<i>C. verum</i> EY				Kontrol (CHL)			
	Zon çap (cm)	MİK (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC	Zon çap (cm)	MİK (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
<i>P. aeruginosa</i>	25	0.5	1.0	2.0	35	0.125	0.25	2.0
<i>A. baumannii</i>	26	0.5	1.0	2.0	30	0.125	0.25	2.0

Tablo 2. *C. verum* uçucu yağının kimyasal bileşim ve etken madde miktarları.

<i>C. verum</i> EY	%	<i>C. verum</i> EY	%
(+)-4-Carene	0.05	Caryophyllene	3.79
Acetaugenol	6.28	Cinnamaldehyde	66.78
Alfa-Cadinol	0.03	Cinnamyl Acetate	3.43
Alfa-Calacorene	0.04	Cis Linalol Oxide	0.02
Alfa-Muuroolene	0.05	Cis-Caryophyllene	0.04
Alfa-Pinene	0.73	Cymol	1.04
Alfa-Terpineol	0.42	Delta-Cadinene	0.34
Benzene Butanoic Acid, Methyl Ester	0.06	Eucalyptol	0.14
Benzene, Pentamethyl-	0.12	Eugenol	6.79
Benzenepropanol	0.13	Germacrene-B	0.12
Benzyl Acetate	0.04	Germacrene-D	0.03
Benzyl Benzoate	3.50	Humulene-1,2 Epoxide	0.20
Beta-Cubenene	0.15	Isoterpinolene	0.02
Beta-Phellandrene	0.30	L-4-Terpineol	0.09
Beta-Sabinyl Acetate	0.04	Limonene	0.30
Beta-Terpinene	0.42	Linalool	2.79
Borneol	0.03	L-Phellandrene	0.55
Cadina-1.4-Diene	0.13	P-Cymene-8-Ol	0.04
Camphene	0.25	Safrole	2.89

C. verum EY'nin MIC ve MBC ölçümleri

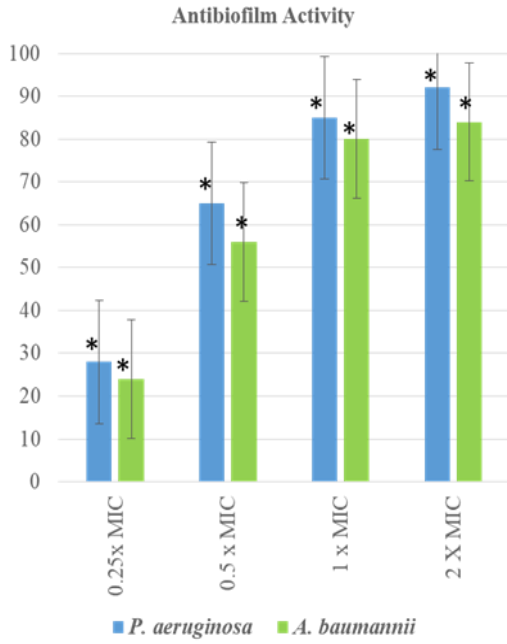
C. verum bitkisinden elde edilen EY'nin *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *A. baumannii* (ATCC 17978) üzerindeki MIC belirlemek için 96 kuyucuklu mikrolate kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarındaki yapılan araştırma sonucuna göre EY'nin MIC değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *C. verum* EY'nin MIC ve MBC değerleri test edilen patojen suşlar üzerinde sırası ile 0.5 ve 1.0 mg/mL konsantrasyonda ve

benzer olarak bulunmuştur. Testin MBC/MIC oranı, *C. verum* yaprak EY'sinin test edilen iki bakteriler üzerinde bakterisidal bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

C. verum EY'nin anti-biyofilm aktivitesi

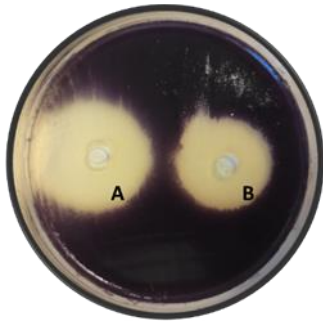
C. verum bitkisinden elde edilen EY'nin çalışmada kullanılan patojenik mikroorganizmalara karşı farklı inhibitör aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. 2 x MIC konsantrasyonda en iyi inhibisyon

aktivitelerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde %92.1 oranda daha yüksek olduğu gözlenmiştir. EY'nin en iyi inhibisyon etkisinin %84 oranında *A. baumannii* (ATCC 17978) üzerinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. *C. verum* bitkisinden elde edilen EY'nin 1 x MIC konsantrasyonda bile yüksek *C. verum* bitkisinden elde edilen EY'nin 1 x MIC konsantrasyonda bile yüksek biyofilm inhibisyonuna sahip olduğu görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Patojenik bakterilere karşı *C. verum* bitkisinden elde edilen EY'nin farklı MIC konsantrasyonlarında (0.25 -2 x MIC) anti-biyofilm aktivitesi.

* $p < 0.05$ 'te kontrolden önemli farklılıkları gösterir ve $p < 0.05$ 'te kontrolden maksimum anlamlı farklılıkları gösterir.



Şekil 2. *C. verum* bitkisinden elde edilen EY'nin *C. violaceum* üzerindeki inhibisyon zon aktivitesi
A: 2 mg/mL (zon çapı: 24 cm) ve B: 1 mg/mL (zon çapı: 18 cm).

C. verum EY'nin anti-QS aktivitesi

Tarçın EY'nin anti-QS aktivitesinin belirlenmesi için indikatör suş olarak *C. violaceum* ATCC 31532 kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda gerçekleştirilen çalışmada Tarçın EY'nin 2 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonunda anti-QS aktivitesinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlar, violacein pigmentinin arka planına karşı bulanık bir zon bölgesi oluşturması açısından cm olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2).

C. verum EO'nun kimyasal bileşimi

C. verum bitkisinin yapraklarının kimyasal bileşiminde sinamaldehyt (%66.781) oran ile en yüksek bulunan bileşik olduğu görülmektedir. Sinamaldehyt ardından öjenol (%6.79) ve analoglarının da oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2) (Zhao ve Ma, 2016).

TARTIŞMA

Son yıllarda, çeşitli bitkilerden elde edilen EY'ler, patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkinlikleri nedeniyle araştırmacılar arasında büyük bir akademik ilgi düzeyine ulaşmış durumdadır. Ancak her bitki türünün her mikroorganizma üzerindeki etkinliğinin farklı olduğu düşünüldüğünde, araştırmalarda hala eksiklikler olduğu görülmektedir. Özellikle EY'lerin anti-biyofilm ve anti-QS aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bizim de çalışmamızda *C. verum* yaprağından elde edilen EY'nin antibakteriyel, anti-biyofilm ve anti-QS özelliklerinin *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* patojenleri üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. *C. verum* bitkisinden elde edilen EY'nin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır ve veriler bizim çalışma verilerimiz ile uyumlu görünmektedir. *C. verum* EY'nin 21 bakteri suşuna karşı antimikrobiyal özelliği test edildiği bir çalışmada, test edilen Gram pozitif (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*) ve Gram negatif (*P. aeruginosa*) bakteri suşlarına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Chao, 2000). Başka bir çalışmada 13 farklı bitkiden elde edilen EY'nin 65 farklı bakteri üzerindeki bakteriyostatik ve bakterisidal aktivitesinin araştırıldığı çalışma sonucunda özellikle *C. verum* kabuğundan elde edilen yağın diğer bitki türlerine göre dirençli suşlar üzerinde daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Mayaud, 2008). Patojen bakteriler tarafından biyofilm oluşturma yeteneği önemli bir endişe kaynağıdır (Ciofu ve Tolker-Nielsen, 2019). Biyofilmler, yoğun popülasyonlardaki bakterilerden oluşur ve bir yüzeye geri döndürülemez şekilde bağlı sağlam bir ekzopolimer matris tarafından korunur. Biyofilm oluşumu, antimikrobiyal ajanları başarısız hale getirmesi ve enfeksiyonların %65-80'inden sorumlu olması nedeni ile antimikrobiyal direncin gelişiminde oldukça büyük öneme sahiptir (Coenye ve Nelis, 2010).

Yapılan son çalışmalarda, hayvanlardan (lizozimler, kitosan ve laktoferrin), bitkilerden (lektinler, fenolikler, EY'ler ve poliasetenler), mantarlardan, alglerden ve bakterilerden (reuterin ve bakteriyosin) elde edilen antimikrobiyal özelliğe sahip ajanların biyofilmler üzerinde inhibisyon etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, mevcut istatistiklerde bulaşıcı hastalıkların tedavisinde toksik olmayan, uygun maliyetli ve erişilebilir terapötiklerin kullanılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır (Wijesinghe, 2021). Bakteriyel biyofilm oluşumu, hücre yoğunluğunun izlenmesi için kullanılan hücreler arası kimyasal sinyal mekanizması olan QS yoluyla gerçekleşir (Gerdt ve Blackwell, 2014). Bu nedenle, mikrobiyal enfeksiyon kontrolünde, özellikle biyofilm kontrolünde bitkisel ilaçların potansiyel uygulamaları geniş çapta araştırılmalıdır.

QSI inhibitörleri özellikli dirençli mikroorganizmalara karşı savaşta yeni stratejilerin geliştirilmesi açısından yeni bir yaklaşım olabilir. QS inhibisyonu, sinyalleşmeyi bozarak QS'yi önleme sürecidir. Bu, sinyal enzimlerini etkisiz hale getirerek, sinyal moleküllerini taklit eden ve reseptörlerini bloke eden moleküller ekleyerek veya sinyal moleküllerinin kendilerini bozarak elde edilir. QS inhibisyonu, bakteriyel büyümeye müdahale etmeden, bakteriyel virülans faktörlerinin müteakip inhibisyonu ile bakteriyel virülansın zayıflaması ile sonuçlanması büyük önem taşımaktadır (Shaaban, 2019; Carradori, 2020).

Çalışmalarda özellikle, *P. aeruginosa*'nın virülans davranışını hedefleyen otoindükleyicilerin öncülleri antipatojenik ajanlar için uygun bir kaynak olarak geliştirilmiştir. β -keto-dekanoik asidin antranilat ile yoğunlaştırılması, *Pseudomonas* kinolon sinyallerinin oluşmasına neden olur. Metil antranilat, *P. aeruginosa*'da nispeten önemli bir virülans faktörü olan elastazın ortadan kaldırılmasıyla *Pseudomonas* kinolon sinyallerinin üretimini inhibe eden bir antranilat analogu olarak kanıtlanmıştır (Calfee, 2001). Yanık enfeksiyonları, keratit ve pnömoni gibi *Pseudomonas*'ın lokalize enfeksiyonları sırasında elastazın rol oynadığı belgelenmiştir (LaSarre & Federle, 2013). Ayrıca, tanik asit ve trans -sinnamaldehit, asil-homoserin lakton (AHL) üretimini engellediği bildirilmiştir (Chang, 2014). Çeşitli bitki türlerinin QS inhibisyonu üzerine etkisine yönelik yapılan çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalardan birinde farklı bitki türleri kullanılmıştır. Çalışmada (*C. verum*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris* ve *Eugenia caryophyllata*) elde edilen EY'nin antioksidan, antibakteriyel, anti-biyofilm ve anti-QS aktiviteleri üzerinde inhibisyona sahip en etkili bitki türünü *C. verum* olarak bulmuşlardır (Alibi, 2020).

C. verum bitkisine ait EY'lerin antibakteriyel ve anti-biyofilm aktivitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada yağın, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı in vitro özellikleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda *C. verum* EY'nin,

test edilen tüm suşlarda etkili bir antibakteriyel ve anti-biyofilm aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Wijesinghe, 2021). Yine benzer bir başka çalışmada 83 uçucu yağın *P. aeruginosa* üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi araştırılmış ve çalışma sonucunda tarçın kabuğu yağı ve ana bileşeni olan sinnamaldehitin (%0.05 oranında), *P. aeruginosa* üzerinde biyofilm oluşumunu önemli ölçüde engellediği belirtilmiştir (Kim, 2015).

Tarçın yağının *P. aeruginosa*'da QS kontrollü virülans faktörleri ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada tarçın yağının biyofilm oluşumunu engellediği ve çok düşük konsantrasyonlarda bile (0.1-0.2 μ l/ml) QS'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Kalia, 2015). Yakın zamanda yapılan yine benzer bir çalışmada da *C. verum*'dan elde edilen saflaştırılmış bileşikler, 0.1 mg/ml'lik bir konsantrasyonda *P. aeruginosa* üzerinde hem anti-biyofilm hem de anti-QS etkiye sahip olduğu görülmüştür (Alva, 2021). Bu alanda yapılan çalışmalar sınırlı olup *C. verum* yaprağı yağının anti-biyofilm ve anti-QS etkisi ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

QS inhibisyonu, sinyalleşmeyi bozarak QS'yi önleme sürecidir. Bu, sinyal enzimlerini etkisiz hale getirerek, sinyal moleküllerini taklit eden ve reseptörlerini bloke eden moleküller ekleyerek veya sinyal moleküllerinin kendilerini bozarak elde edilir. QS inhibisyonu, bakteriyel büyümeye müdahale etmeden, bakteriyel virülans faktörlerinin müteakip inhibisyonu ile bakteriyel virülansın zayıflaması ile sonuçlanacaktır.

Tarçın yağının ana bileşeni olduğu bildirilen sinnamaldehit ve sinnamaldehit türevlerinin *Vibrio harveyi* üzerindeki anti-QS aktivitesinin araştırıldığı çalışmada etken maddelerin bakteri üremesini engellemeden QS ile etkileşime girdiğini göstermektedir (Brackman, 2008). Benzer şekilde, *C. verum* kabuğu esansiyel yağının çoklu ilaca dirençli *E. coli* üzerindeki zar geçirgenleştirici etkilerini bildirmiş olup aynı zamanda, bu yağın anti-QS aktivitesini de göstermişlerdir (Yap, 2014). *C. verum* bitkisinden elde edilen EY'lerin *A. baumannii* üzerinde anti-biyofilm ve anti-QS aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışmanın bu alanda ilk olduğu düşünülmektedir.

C. verum yaprağı yağından elde edilen GC-MS analiz sonuçlarına bakıldığında *C. verum* yaprağı yağında Eugenol (%74,9) oranında bulunurken, β -karyofillen (%4), Benzil benzoat (%3) ve diğer birkaç bileşen tanımlanmıştır (Schmidt, 2006). Tarçın kabuğu yağının GC-MS analiz sonuçlarında %64.49 oranında sinnamaldehit bulunurken %16.57 oranında öjenol bulduklarını bildirmişlerdir (Kim, 2015). Bu sonuçlar %66.78 oranında bulduğumuz sinnamaldehit ile %6.79 oranında bulduğumuz öjenol içeriği ile büyük benzerlik göstermektedir.

SONUÇ

Antibiyotiklerin düzensiz kullanımı sonrasında, çoklu ilaca dirençli patojen mikroorganizmaların sayılarının ortaya çıkması, alternatif yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Yapmış olduğumuz çalışma ve bu alanda tartışılan tüm gözlemlerde, *C. verum* yaprağı esansiyel yağının *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarına karşı yüksek antibakteriyel ve anti-biyofilm aktivite gösterdiği sonucuna varabiliriz. Bakterilerde görülen QS sisteminin anlaşılması, bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmede ve antibiyotik direncinin ortaya çıkmasının üstesinde gelmede umut verici yeni bir antibakteriyel strateji sağlayabileceğinden bu alanda daha fazla araştırmaya gerek vardır.

Çıkar Çatışması

Bu makalede yazar, araştırma, yazarlık ve/veya yayım ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: EK; Gereç ve Yöntem: EK; Veri analizi ve yorum: EK; Yazım ve düzeltmeler: EK.

Finansal Destek

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Proje No: PYO-FEN.4001.16.012 tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Abudoleh, S. M., & Mahasneh, A. M. (2017). Anti-quorum sensing activity of substances isolated from wild berry associated bacteria, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 9(1), 23-30.

Alibi, S. Selma, W. B., Ramos-Vivas, J., Smach, MA., Touati R., & Boukadida J., (2020). Antioxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, 68(2), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.01.001>.

Alva, P. P. Suresh, S., Nanjappa, D. P, James, J. P., Kaverikana, R., & Chakraborty, A. (2021). Isolation and identification of quorum sensing antagonist from *Cinnamomum verum* leaves against *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences*, 267(15), 118878.

Barzegari, A. Kheyrolahzadeh, K., Khatibi, S. M. H., Sharifi, S., Memar, M. Y., & Vahed, S. Z. (2020). The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infection and Drug Resistance*, 13, 659-672. <https://doi.org/10.2147/IDR.S232982>.

Bassetti, M. Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7, 1-18.

Bhagat, K. (2019). Design, synthesis, antimicrobial evaluation, and molecular modeling studies of novel indolinedione coumarin molecular hybrids. *ACS Omega*, 4(5), 8720-8730. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02481>.

Brackman, G. (2008). Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Mikrobiyol*, 8, 149 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-149>.

Calfee, M. W., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2001). Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the United States National Academy of Sciences*, A98, <https://doi.org/11633-11937.10.1073/pnas.201328498>

Carradori, S., Giacomo, N. D., Lobefalo, M., Luisi, G., Campestre, C., Sisto, F. (2020). Biofilm and Quorum Sensing inhibitors: the road so far. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(12):917-930. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1830059>.

Chang, C. Y., Krishnan, T., Wang, H., Chen, Y., Yin, W. F., Chong, Y. M., Tan, L. Y., Chong, T. M., & Chan, K. G. (2014). Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target. *Scientific Reports*, 4, 7245. <https://doi.org/10.1038/srep07245>.

Chao, S. Young, D. G., & Oberg, C. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639-649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>.

Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents- How *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>.

Coenye, T., & Nelis, H. J. (2010). In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83:89-105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>.

Firmino, D. F. Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., Firmino, N. C. S., Rosa, L. D., & de Carvalho, M. G. (2018). Antibacterial and antibiofilm activities of *Cinnamomum* spp. essential oil and cinnamaldehyde, *Antimicrobial Activities Scientific World Journal*, 7405736. <https://doi.org/10.1155/2018/7405736>.

Gerdt, J. P., and Blackwell, H. E. (2014). Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. *ACS Chemical Biology*, 9, 2291-2299. doi: 10.1021/cb5004288.

Haddi, K. Faroni, L. R., & Oliveira, E. E. (2017). Cinnamon oil, in: leo ml and nollet hsr (ed), green pesticides handbook, essential oils for pest control. 1st Edition. Boca Raton, CRC Press, 523, 117-150.

Jayaprakasha, G. K., & Rao, L. J. M. (2011). Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 547-562.

Kalia, M. Yadav, V. K., Singh, K. P., Sharma, D., Pandey, H., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2015). Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 10 (8), e0135495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135495>.

- Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, S., Baek, K. H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, *16*(195), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.028>.
- Kiray, E. Antibiofilm and anti-quorum sensing activities of vaginal origin probiotics. *European Journal of Biology*, 2021; *80*(2): 82-90. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2021.932640>.
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *77*, 73-111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>.
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Comparative Study Lett Appl Microbiol*, *47*(3), 167-73.
- Rad, J. S., Dey A., Koirala, N., Shaheen, S., Omari, N. E., Salehi, B., Goloshvili, T., et al. (2021). *Cinnamomum* species: bridging phytochemistry knowledge, pharmacological properties and toxicological safety for health benefits. *frontiers in pharmacology*, *11*(12), 600139. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.600139>.
- Rao, P. V., & Gan, S. H. (2014). Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 642942.
- Schmidt, E. (2006). Composition and antioxidant activities of the essential oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) leaves from Sri Lanka. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *Pl* 9, 170-182. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2006.10643490>
- Shaaban, M., Elgaml, A., & Habib, E. E. (2019). Biotechnological applications of quorum sensing inhibition as novel therapeutic strategies for multidrug resistant pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 127:138-143. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.043>.
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *8*, 76.
- Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Kowalczyk, E., Wiktorowska-Owczarek, A., Marta Józwiak-Bębenista, M., & Łysakowska, M. (2014). The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils. *Molecules*. *19*(12), 20929–20940. <https://doi.org/10.3390/molecules191220929>.
- Theodora, N. A., Dominika, V., & Waturangi, D. E. (2019). Screening and quantification of anti-quorum sensing and antibiofilm activities of phyllosphere bacteria against biofilm forming bacteria. *BMC Research Notes*, *12*(1), 732. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4775-1>.
- Uğur, M., & Genç, S. (2019). Three year resistance profile of acinetobacter baumannii and *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from intensive care units. *Turkish Journal of Intensive Care*, *17*, 130-7. <https://doi.org/10.4274/tybd.galenos.2018.94103>.
- Wijesinghe, G., Feiria, S. B., Maia, F. C., Oliveira, T. R., Joia, F., Barbosa, J. P., & Boni, G. C. (2021). In-vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Cinnamomum verum* leaf oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *93*(1), e20201507. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201507>.
- Yap, P. S. Krishnan, T., Chan, K. G., & Lim, S. H. (2014). Some evidences on the mode of action of *Cinnamomum verum* bark essential oil, alone and in combination with piperacillin against a multidrug resistant *Escherichia coli* strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(8), 1299-306. <https://doi.org/10.4014/jmb.1407.07054>.
- Zhao, X. Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*, *8*(3), 425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425>.
- Zhong, C. (2019). Design and synthesis of new N-terminal fatty acid modified-antimicrobial peptide analogues with potent in vitro biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *182*, 111636. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111636>.