

Trigonella cylindracea Desv.'nin Farklı Kısımları Üzerine *In Vitro* Çalışmalar: Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktiviteleri

In Vitro Studies on Different Parts of *Trigonella cylindracea* Desv.: Antimicrobial and Antibiofilm Activities

Ş. Selma Uras Güngör^{1*}, Zehra Öksüz²

¹ Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

² Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

* Sorumlu yazar: urasselma@mersin.edu.tr

Özet

Bu çalışmanın amacı *Trigonella cylindracea* Desv. türünün tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerinin araştırılmasıdır. Antimikrobiyal aktivite, standart mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak beş referans bakteri ve üç referans fungal suş üzerinde yapıldı. Ek olarak, ekstrenin *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu inhibe etme ve önceden oluşturulmuş biyofilmi yok etme potansiyeli kristal viyole yöntemi kullanılarak belirlendi. Etanollü ekstraların çalışmaya dahil edilen mayalar üzerinde (125-62.5 µg/mL) antimikrobiyal etkinliği bakterilere (250-125 µg/mL) kıyasla daha iyi bulunsa da genel olarak orta ve düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Biyofilm testleri tohum kabuğu ekstresinin sub-MİK'de (0.5X) biyofilm oluşumunu %50 oranında azaltabildiğini göstermiştir. Ayrıca tohum ve tohum kabuğu ekstralarının önceden oluşmuş biyofilmi MİK'in üzerinde (2X) %50 oranında azaltabildiği de belirlendi. Sonuç olarak bulgularımız, *T. cylindracea*'nin farklı kısımlarından elde edilen etanollü ekstraların antimikrobiyal potansiyellerinin düşük/orta olmasına rağmen antibiyofilm potansiyelinin olduğunu ortaya koymaktadır. Literatür taraması *T. cylindracea* türünün antimikrobiyal ve antibiyofilm potansiyelinin ilk defa bu çalışmada araştırıldığını göstermiştir. Bu nedenle bulgularımız bu türün antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi ile ilgili literatüre önemli ön veriler sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyofilm, Antimikrobiyal, Çemenotu, Etanol ekstresi, *Trigonella*.

Abstract

The aim of this study is to investigate, the antimicrobial and antibiofilm activities of ethanol extract prepared from the seeds, aerial parts and seed coats of *Trigonella cylindracea* Desv. Antimicrobial activity was determined by using standard microdilution method by five reference bacteria and three reference fungal strains. In addition, the effects of *P. aeruginosa* on biofilm formation and preformed biofilm were investigated by crystal violet staining method. Although the antimicrobial activity of ethanolic extracts on the yeasts included in the study (125-62.5 µg/mL) was slightly better than on bacteria (250-125 µg/mL), it was found that they generally showed moderate and low antimicrobial activity. Biofilm tests have shown that seed coat extract can reduce biofilm formation by 50% at sub-MIC (0.5X). It was also determined that the seed and seed coat extracts were able to reduce the preformed biofilm by 50% above the MIC (2X). In conclusion, our findings reveal that ethanolic extracts obtained from different parts of *T. cylindracea* have antibiofilm potential although their antimicrobial potentials are low/moderate. The literature review showed that the antimicrobial and antibiofilm potential of *T. cylindracea* was investigated for the first time in this study.

Therefore, our findings provide important preliminary data to the literature on the antimicrobial and antibiofilm activity of this species.

Keywords: Antibiofilm, Antimicrobial, Fenugreek, Ethanol extract, *Trigonella*.

Giriş

Trigonella L. cinsi Fabaceae familyasına aittir ve doğu Akdeniz, batı Asya, güney Avrupa, kuzey ve güney Afrika, güney Avustralya çevresindeki kuru bölgelerde yaygın olarak dağılmış yaklaşık 135 tür içermektedir. Cinsin bazı taksonları gıda ve tıpta kullanılmakta, antik çağlardan beri özellikle Yunanistan ve Mısır'da bilinmekte ve farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Akan ve ark., 2020). Çemenotu olarak bilinen *Trigonella foenum-graecum*, nutrasötik olarak ve tıpta kullanımıyla bilinmektedir. Bu türün yanı sıra *T. occulta* Del., *T. incisae* Royle, *T. corniculata* L., *T. arabica* Delile ve *T. berythea* Boiss. & Blanche gibi cinsin bazı türleri de baharat ve/veya sebze olarak ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Jain ve ark., 1996; Srinivasan, 2006; Jaradat ve ark., 2016; Rao ve Rao, 2018; Singh ve ark., 2022). Türkiye'de *Trigonella* L. cinsi 10 seksiyona ayrılmıştır. *T. cylindracea* Desv. türü *Cylindraceae* Boiss. Seksiyonu'na ait bir tür olup Türkiye'de "Boruboyotu" olarak bilinmektedir. *T. cylindracea*, Türkiye'nin özellikle güney kesimlerinde Antalya ve Mersin'in kumlu alanlarında yaygın olarak bulunan tek yıllık otsu bir bitkidir (Akan ve ark., 2020).

Son yıllarda, bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin, çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olduğu ve biyofilm oluşumu sürecinde hücre yapışmasını/bağlanmasını baskılayarak biyofilmin hücre dışı polimerik matriks oluşumunu engellediği ve antibiyofilm ajanı olarak potansiyele sahip olduğu kanıtlanmıştır (Lagha ve ark., 2019).

Antibiyotiğe dirençli mikroorganizmalar tüm dünyada mortalite ve morbidite oranlarını arttıran en önemli risk faktörlerden birisidir (Golkar ve ark., 2014). 2011 yılında yayınlanan bir rapor gelişen enfeksiyonların %60'ından fazlasının önceki yıla kıyasla pan-dirençli ve tedavi edilmesi daha zor bir mikroorganizma tarafından oluşturulduğunu ortaya koymuştur (Spellberg ve Gilbert, 2014). Antibiyotik direncinin gelişiminde, bu ilaçların aşırı ve yanlış kullanımının yanı sıra mikroorganizmaya ait özellikler de önemlidir (Ventola, 2015). Yapılan çalışmalar biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bakterilerin planktonik formlarına kıyasla konak immün savunmasına ve antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli olduğunu göstermiştir (Fernández ve ark., 2011). Biyofilm, ekzopolisakkarit, nükleik asit, protein ve diğer bileşiklerden oluşan hücre dışı polimerik matris içine gömülü organize bakteri topluluklarıdır (Berlanga ve Guerrero, 2016; Melander ve ark., 2020). Kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olan önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilen biyofilm, enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar yaratmakta ve tedavi seçeneklerini ciddi şekilde sınırlandırmaktadır (Grant ve Hung, 2013; Melander ve ark., 2020). Günümüzde biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde onaylanmış terapötiklerin eksikliği nedeniyle, geliştirilen antimikrobiyallerin biyofilm oluşumunu önleme ve etken mikroorganizmayı ortadan kaldırma potansiyeli büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle biyofilm inhibisyonu, çeşitli enfeksiyonların tedavisi için ana ilaç hedefli olarak kabul edilir (Hengzhuang ve ark., 2012).

Literatürde *Trigonella* L. ile ilgili çok sayıda rapor yer almasına rağmen henüz *T. cylindracea*'nin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. *T. cylindracea* ile ilgili çalışmalar sınırlıdır ve genellikle morfoloji, taksonomi ve bazı fitokimyasal bileşenlerine odaklanılmıştır. Bu nedenle; bu çalışmada *T. cylindracea* tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu kısımlarının etanol ekstraktlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm-potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bitkisel materyal

Çalışılan *T. cylindracea* türü Türkiye'nin Mersin (C4: İçel, Tömük, 0-20 m.) ilinden toplandı. Bitki Dr. Öğr. Üyesi Ş. Selma URAS GÜNGÖR tarafından teşhis edildi. Bitkisel materyale ait herbaryum örnekleri Hatay, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryum'da (MKU1755) saklanmaktadır.

Ekstre hazırlama

Öğütülmüş tohum (CYL/1), toprak üstü (CYL/2) ve tohum kabuklarından (CYL/3) elde edilmiş, etanollü (Merck; Darmstadt, Germany) ekstreler [1:20 (a/h); ×3; etanol (% 96)] oda sıcaklığında 3 gün boyunca karıştırılarak elde edildi, daha sonra Whatman Grade No.1 filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Çözücü, bir vakumlu evaporatör ile uçuruldu ve ekstre, aktivite çalışmalarına kadar 4°C'de karanlıkta saklandı (Güzel Kara ve ark., 2021).

Biyolojik aktivite testleri

Mikrobiyal suşlar

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarına *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Acinetobacter baumannii* ATCC 02026, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 olmak üzere 5 referans bakteri ve *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 15126 ve *Candida parapsilosis* ATCC 90018 olmak üzere 3 referans fungal suş dahil edildi. Bakteri [Mueller-Hinton agarda (Merck, Almanya)] ve mayaların [Sabouraud dekstroz agarda (Merck, Almanya)] 24 saatlik taze kültürlerinden stok mikroorganizma süspansiyon konsantrasyonları McFarland 0.5 (5×10^5 CFU/mL) olarak ayarlandı.

Antibakteriyel ve antifungal testler

Antimikrobiyal duyarlılık testi standart mikrodilüsyon yönteminde modifikasyonlarla gerçekleştirildi (Jorgensen ve Ferraro, 1998). Kısaca, ekstrelerin stok çözeltileri 1000 µg/mL dimetil sülfoksitle (DMSO) hazırlandı. Bakteriler için Müeller-Hinton Broth (MHB) (Merck, Almanya) mayalar için Sabouraud dekstroz broth (SDB) (Merck, Almanya) kullanılarak ekstrelerin stok çözeltilerinin iki kat seri dilüsyonları 500 ila 3.90 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda 96'lık mikropakada hazırlandı. Ardından 0.5 McFarlanda göre ayarlanan 5 µL standardize bakteri veya maya süspansiyonu her kuyucuğa eklendi. Mikroorganizma süspansiyonu eklenmeyen kuyular ortam kontrolü için, test edilen ekstrelerin eklenmediği kuyular ise mikrobiyal büyümenin kontrolü için hazırlandı. 24 saat inkübasyondan sonra minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) görsel olarak ve 630 nm optik yoğunlukta (OD) bir mikropakla spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak belirlendi. Referans ilaç olarak ampicilin (Sigma, ABD) ve flukonazol (Sigma, ABD) kullanıldı. Testler iki kopya halinde gerçekleştirildi ve DMSO'nun bakteri ve maya suşlarının büyümesine etkisinin olup olmadığı ayrıca test edildi.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesinin belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen suşların biyofilm oluşturma kapasitesi, kristal viyole (CV) boyama yönteminde modifikasyonlarla belirlendi (O'Toole, 2011). İlk olarak, 96 kuyulu mikropakla kuyularına 100 µL MHB aktarıldı ve 5×10^5 CFU/mL'ye ayarlanmış 10 µL stok mikroorganizma hücre süspansiyonları eklendinerek 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında kuyucuklardan hücre süspansiyonları nazikçe aspire edildi. Daha sonra mikropakla, yapışmayan hücreleri uzaklaştırmak için steril fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkandı. İkinci aşamada mikropakanın kuyularına 150 µL metanol eklenerek 15 dakika bekletildi ve biyofilmler fikse

edildi. Süre sonunda kuyulardaki metanol aspire edildi ve mikroplaka kuyuları havada kurutuldu. Üçüncü aşamada mikroplaka kuyularına 150 µL %0.5 CV solüsyonu eklendi ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda mikroplaka kuyularındaki CV solüsyonu aspire edildi ve üç kez PBS ile yıkandı. Son adımda ise mikroplaka kuyularına 150 µL %95 etanol eklendi, 30 dakika bekletildi ve optik dansitenin (OD) belirlenmesi için yeni bir mikroplaka kuyucuğuna aktarıldı. Biyofilm oluşumu, bir mikroplaka spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak 550 nm'de OD'da absorbans ölçülerek belirlendi. Negatif kontrol olarak mikroorganizma inokulumu olmayan kuyucukların OD değerleri kullanıldı. Testler iki kopya halinde gerçekleştirildi. Daha sonra izolatin biyofilm üretim kapasitesi belirlendi (Tekintaş ve ark., 2020).

Biyofilm önleme ve eradikasyon testleri

Ekstrelerin hem önceden oluşturulmuş biyofilmi yok etme hem de biyofilm önleme potansiyeli CV boyama testinde modifikasyonla belirlendi (Zhong ve ark., 2019). Biyofilm testleri en iyi biyofilm üretim kapasitesine sahip suşlardan biri olduğu için *P. aeruginosa*'nın biyofilmi üzerinde yapıldı. Biyofilm önleme deneyi için, 96'lık mikroplaka kuyularına 100 µL MHB dağıtıldı ve ekstraktın 0.5X ve 0.25X sub-MİK konsantrasyonlarında seri seyreltmeleri yapıldı. Ardından, mikroplaka kuyucuklarına 5 µL McFarland 0.5'e ayarlı mikroorganizma süspansiyonu eklendi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, "Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi" bölümünde açıklandığı gibi CV boyama testi adımları izlenerek ekstrelerin biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli belirlendi (O'Toole, 2011). Biyofilm eradikasyon testi için 96'lık mikroplaka kuyucuklarına 100 µL MHB dağıtıldı ve her bir kuyucuğa 5 µL McFarland 0.5'e ayarlı mikroorganizma süspansiyonu eklenerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, süpernatantlar nazikçe aspire edildi ve her bir kuyucuğa ekstrelerin 1X ve 2X MİK konsantrasyonlarından 100 µL ilave edilerek tekrar 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra, "Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi" bölümünde açıklandığı gibi CV boyama testi adımları izlenerek ekstrelerin önceden oluşturulmuş biyofilmi inhibe etme potansiyeli belirlendi (O'Toole, 2011). Her iki antibiyofilm deneyinde de PBS negatif kontrol olarak kullanıldı. Hem ekstraktın önceden oluşturulmuş biyofilm üzerindeki etkisi hem de biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli, bir mikroplaka spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak kuyucukların OD'si 550 nm'de ölçülerek değerlendirildi. Biyofilm oluşumunun en az %50 oranında inhibe edildiği en düşük ekstrakt konsantrasyonu olan "Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu (MBIC₅₀)" ve önceden oluşturulmuş biyofilmin en az %50'sini yok etmek için gereken en düşük ekstrakt konsantrasyonu olan "Minimum Biyofilm Azaltma Konsantrasyonu (MBRC₅₀)" belirlendi.

Bulgular

Antimikrobiyal etkinlik

Ekstrelerin, çalışmada test edilen referans bakterilerin büyümesini 250-125 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda, referans mayaların büyümesini ise 125-62.5 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda engellediği belirlendi (Tablo 1). Ayrıca *T. cylindracea*'nın tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu ekstrelerinin çalışmaya dahil edilen referans suşlar üzerine antimikrobiyal etkinlik açısından önemli bir fark bulunamadı.

Tablo 1. Test edilen *Trigonella cylindracea* tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu ekstralarının MİK değerleri (µg/mL).

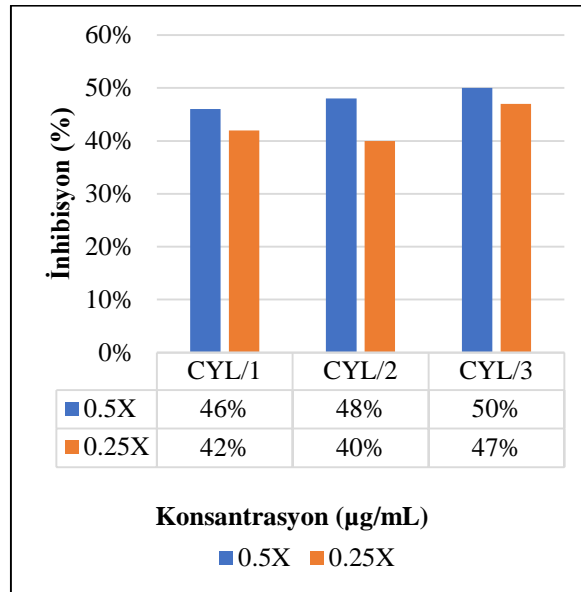
Ekstreler/ Referans antimikrobiya iller	<i>B.</i> <i>subtilis</i> ATCC 6633	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S.</i> <i>aureus</i> ATCC 29213	<i>A.</i> <i>baumannii</i> ATCC 29221	<i>E.</i> <i>faecalis</i> ATCC 29212	<i>C.</i> <i>albicans</i> ATCC 90028	<i>C.</i> <i>glabrata</i> ATCC 15126	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i> ATCC 90018
CYL/1	125	125	250	250	125	125	62.5	62.5
CYL/2	125	125	250	250	125	125	62.5	62.5
CYL/3	125	125	250	250	125	125	62.5	62.5
Ampisilin	*	31.25	*	3.90	*	-	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	-	*	8	*

-Test edilmedi; * Test edilen tüm konsantrasyonlarda etkin

(CYL/1: *T. cylindracea* tohum, CYL/2: *T. cylindracea* toprak üstü, CYL/3 *T. cylindracea* tohum kabuğu)

Biyofilm testleri

Biyofilm önleme testi, CYL/1, CYL/2 ve CYL/3 ekstralarının *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu 0.5X ve 0.25X sub-MİK'de sırasıyla %46, %48 %50 ve %42, %40, %47 oranında inhibe ettiğini gösterdi (Şekil 1).



Şekil 1. 0.5X ve 0.25X MİK konsantrasyonlarda *Trigonella cylindracea* tohum (CYL/1), toprak üstü (CYL/2) ve tohum kabuğu (CYL/3) ekstraları tarafından biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%).

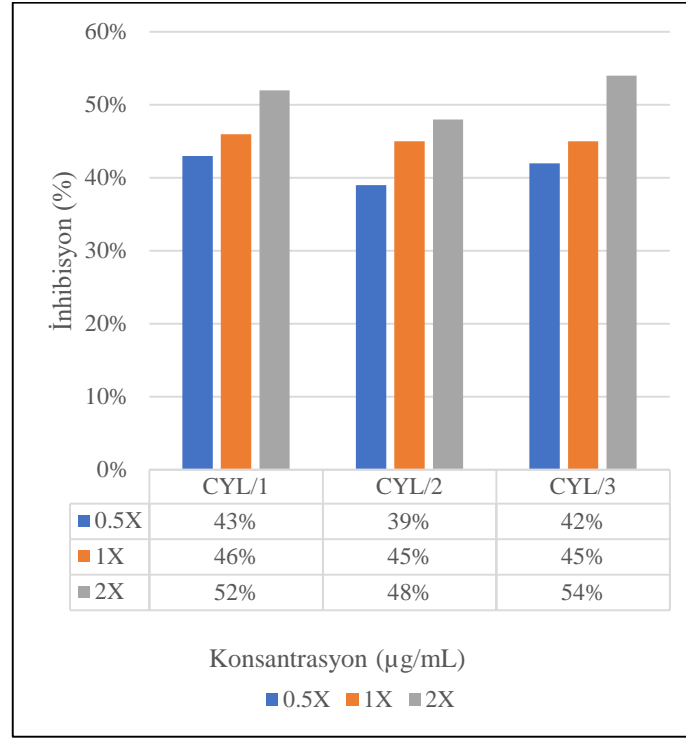
CYL/3 ekstresi MİK değerinde altında (0.5X) biyofilm oluşumunu %50 oranında azaltmıştır bu nedenle MBIC₅₀ değeri 62.5 µg/mL'dir (Tablo 2). Biyofilm eradikasyon testi, *P. aeruginosa* biyofilmleri 24 saat süreyle oluştuktan sonra, CYL/1, CYL/2 ve CYL/3 ekstralarının biyofilm oluşumunu 0.5X, 1X ve 2X MİK'de sırasıyla engelleme oranları Şekil 2'de gösterilmiştir. CYL/1 ve CYL/3 ekstresi MİK değerinde üstünde (2X) konsantrasyonda biyofilm oluşumunu sırasıyla %52 ve %54 oranında azaltmıştır bu nedenle iki ekstrenin MBRC₅₀ değeri 250

$\mu\text{g/mL}$ 'dir (Tablo 2). CYL/2 ekstresi önceden oluşmuş biyofilmi her ne kadar %50 oranında azaltmasada %50'ye yakın (% 48) bir oranda azaltmıştır (Şekil 2).

Tablo 2. *Trigonella cylindracea* tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu ekstralarının *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri

Ekstreler	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MBRC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
CYL/1	125	-	250
CYL/2	125	-	-
CYL/3	125	62.5	250

(CYL/1: *T. cylindracea* tohum, CYL/2: *T. cylindracea* toprak üstü, CYL/3 *T. cylindracea* tohum kabuğu)



Şekil 2. 0.5X, 1X ve 2X konsantrasyonlarda *Trigonella cylindracea* tohum (CYL/1), toprak üstü (CYL/2) ve tohum kabuğu (CYL/3) ekstralarının önceden oluşturulmuş biyofilm inhibisyonu (%).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, *T. cylindracea*'nin farklı kısımlarından (tohum, toprak üstü, tohum kabuğu) elde edilen etanol ekstralarının antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri araştırıldı. Tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu ekstralarının verimleri sırasıyla %17.5, %18.5 ve %24.7 (a/a) olarak tespit edildi.

Literatürde *Trigonella* L. cinsi üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmalar çoğunlukla *T. foenum-graecum* (çemenotu) üzerine olup, Singh et al.'nın (2022) çemenotu ile ilgili yaptıkları çalışmada çemenotunun farklı mikrobiyal patojenlere karşı önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada çemenotunun yaprak ve tohum ekstralarının, 0 ila

20 mm arasında değişen belirgin bir inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2022). Bulgularımız *T. cylindracea* ekstrelerinin, referans antimikrobiallarla (maya için flukonazol, bakteriler için ampisilin) karşılaştırıldığında orta ve düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca ekstreler bakterilerle karşılaştırıldığında mayalara karşı daha iyi antimikrobiyal etki gösterdi. Mayalar açısından değerlendirildiğinde her üç ekstreinin de *C. albicans*'a kıyasla *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'ya karşı daha etkin olduğu belirlendi. Literatür araştırmamız çalışmaya dahil ettiğimiz bu tür ile ilgili yapılmış herhangi bir antimikrobiyal aktivite çalışması bulunmadığını göstermiştir. Bu nedenle *T. cylindracea* ekstrelerinin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi açısından literatüre önemli ön veriler sunmaktadır.

Biyofilm testlerine dahil edilen *P. aeruginosa*, hem akut hem de kronik enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir patojendir (Thi ve ark., 2020). Biyofilm oluşumu için çok önemli olan Quorum sensing (QS) düzenleyici sistemi ile bir dizi virülans faktörü üretebilir (Ben Haj Khalifa ve ark., 2011). Bitkiler, biyoaktif moleküllerin büyük bir kaynağını temsil etmektedir. Yakın zamanda yapılan bir araştırma bazılarının, Quorum sensing (QS) kesintiye uğratan ve/veya bakteriyel adezyonu önleyen anti-biyofilm bileşiklerini içerebileceklerini göstermiştir (Husain ve ark., 2015). Literatürde *Trigonella* L. cinsine ait türlerin antibiyofilm aktivitesi ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Husain et al., (2015) yaptığı çalışmada *T. foenum-graecum* tohumlarının, bitki tarafından kafein üretimi ile bağlantılı aktivite ile *Aeromonas hydrophila* ve *P. aeruginosa*'da QS ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği göstermiştir (Husain ve ark., 2015).

Literatür araştırmamız çalışmaya dahil ettiğimiz *T. cylindracea* türünün antibiyofilm aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışma olmadığını göstermektedir. Bulgularımızı genel olarak değerlendirdiğimizde CYL/3 ekstresinin sub-MİK'de (0.5X) biyofilm oluşumunu %50 oranında inhibe etmesi dikkat çekicidir. Çünkü literatürdeki çalışmalar, biyofilm üreten bakteri hücrelerinin eradikasyonu için daha yüksek ilaç konsantrasyonlarının gerekli olabileceğini göstermektedir (Hengzhuang ve ark., 2012). Her ne kadar sadece CYL/3 ekstresi biyofilm oluşumunu %50 oranında inhibe etse de CYL/1 ve CYL/2 ekstreleri de MİK'in altındaki değerlerde %50'ye yakın bir oranda biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir.

Ayrıca CYL/1, CYL/2 ve CYL/3 ekstreleri önceden oluşmuş biyofilmi yok etme potansiyeline de sahiptir. Antibiyofilm etkinliği açısından tohum, toprak üstü ve tohum kabuğu ekstreleri kıyaslandığında üç ekstreinin biyofilm inhibisyonu ve önceden oluşmuş biyofilmi yok etme potansiyeli birbirinden çok farklı olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *T. cylindracea* tohum, toprak üstü ve tohum kabuklarının antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri ilk kez çalışılmıştır. Bu nedenle çalışmamız bu tür hakkında literatüre önemli ön veriler sunmaktadır. Araştırmamız ekstrelerin düşük ve orta antimikrobiyal aktivite göstermesine rağmen antibiyofilm potansiyellerinin dikkat çekici olduğunu göstermektedir. Doğal bileşiklerin düşük maliyet, bol miktarda bulunabilme gibi avantajlarından dolayı antimikrobiyal ajan ve gıda stabilizatörleri olarak kullanımları gün geçtikçe artmaktadır. Bulgularımız, *T. cylindracea*'nin çeşitli endüstriler için yeni terapötik ajanların ve gıda takviyelerinin geliştirilmesinde umut verici bir kaynak olabileceği göstermektedir. Ayrıca çalışmamız hayvan deneyleri ve toksisite testleri gibi ileri araştırmaların yapılmasıyla birlikte bu türün enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyofilm ajanı olarak potansiyellerini değerlendirmeyi amaçlayan yeni araştırmalara öncülük edecektir.

Kaynaklar

Akan, H., Ekici, M. ve Aytac, Z. 2020. The synopsis of the genus *Trigonella* L. (Fabaceae) in Turkey. Turkish Journal of Botany, 44: 670-693. <https://doi.org/10.3906/bot-2004-63>

- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H. ve Khedher, M. 2011. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Annales de Biologie Clinique*, 69 (4): 393-403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- Berlanga, M. ve Guerrero, R. 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 5: 165. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
- Fernández, L., Breidenstein, E.B.M. ve Hancock, R.E.W. 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14: 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.001>
- Golkar, Z., Bagazra, O. ve Pace, D.G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection Developing Countries*, 8 (2): 129-136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Grant, S.S. ve Hung, D.T. 2013. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*, 4 (4): 273-283. <https://doi.org/10.4161/viru.23987>
- Güzel Kara, S., Ülger. ve Kahraman, A. 2021. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia virgata* mericarps. *Botanica Serbica*, 45 (2): 223-231. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2102223G>
- Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O, Song, Z. ve Hoiby, N. 2012. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56: 2683-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.06486-11>
- Husain, F.M., Ahmad, I., Khan, M.S. ve Al-Shabib, N.A. 2015. *Trigonella foenum-graecum* (Seed) Extract Interferes with Quorum Sensing Regulated Traits and Biofilm Formation in the Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015 :1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/879540>
- Jain, S.C., Agrawal, M. ve Sharma, R.A. 1996. The Genus *Trigonella*-Phytochemistry and Biology. *Ancient Science of Life*, 16 (2): 108-117.
- Jaradat, N.A., Shawahna, R., Hussein, F. ve Al-Lahham, S. 2016. Analysis of the antioxidant potential in aerial parts of *Trigonella arabica* and *Trigonella berythea* grown widely in Palestine: A comparative study. *European Journal of Integrative Medicine*, 8 (5): 623-630. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.04.004>
- Jorgensen, J.H. ve Ferraro, M.J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practice. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 973-80. <https://doi.org/10.1086/513938>
- Lagha, R., Abdallah, F.B., Al-Sarhan, B.O. ve Al-Sodany, Y. 2019. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules*, 24 (6): 1161. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
- Melander, R.J., Basak, A.K. ve Melander, C. 2020. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural Product Report*, 37 (11): 1454-1477. <https://doi.org/10.1039/d0np00022a>
- O'Toole, G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47: 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>

- Rao, N. ve Rao, P.B. 2018. Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) analysis for evaluation of variation in mineral content in different varieties of *Trigonella foenum-graecum* L. *Legume Research*, 41 (1): 132-134. <https://doi.org/10.18805/lr.v0i0.8396>
- Singh, N., Yadav, S.S., Kumar, S. ve Narashiman, B. 2022. Ethnopharmacological, phytochemical and clinical studies on Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Food Bioscience*, 46: 1-31. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101546>
- Spellberg, B. ve Gilbert, D.N. 2014. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clinical Infectious Disease*, 59 (2): S71-S75. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu392>
- Srinivasan, K. 2006. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A Review of Health Beneficial Physiological Effects. *Food Reviews International*, 22 (2): 203-224. <https://doi.org/10.1080/87559120600586315>
- Tekintaş, Y., Temel, A., Ateş, A., Eraç, B., Metin, D.Y., Hilmioğlu Polat, S. ve Hoşgör Limoncu, M. 2020. Antifungal and antibiofilm activities of selective serotonin reuptake inhibitors alone and in combination with Fluconazole. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, 17 (6): 667-672. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.65481>
- Thi, M.T.T., Wibowo, D. ve Rehm, B.H.A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (22): 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Ventola, C.L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40 (4): 277-283.
- Zhong, H., Xie, Z., Wei, H., Zhang, S., Song, Y., Wang, M. ve Zhang, Y. 2019. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Temporin-GHc and Temporin-GHd Against Cariogenic Bacteria, *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2854. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02854>