




## Lactobacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Üretilen Biyosürfektanların Anti-Biyofilm ve Anti-Mikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Feride Efe<sup>1</sup> , Zehranur Yüksekdağ\*<sup>2</sup> , Berat Çınar Acar<sup>2</sup> <sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, 06500, Ankara, Türkiye<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

### Öne Çıkanlar

- *S. aureus* bakterilerinin oluşturdukları biyofilmler hem endüstride önemli ekonomik kayıplara hem de insan ve hayvanlar için sağlık problemlerine yol açmaktadır.
- Biyofilm oluşumunun engellenmesinde probiyotik bakterilerden elde edilen biyosürfektanların uygulanması etkili ve önemli bir yöntemdir.
- Biyosürfektan molekülleri, biyolojik bozunabilirlik ve daha az toksisite içermesi nedeniyle sentetik süर्फektanlara kıyasla birçok uygulama alanı için daha avantajlıdır.

### Makale Bilgileri

Geliş: 03/06/2022

Kabul: 04/08/2022

### Anahtar Kelimeler

Lactobacillus sp.,  
Biyosürfektan,  
Anti-biyofilm,  
Anti-mikrobiyal

### Öz

Bu çalışmada, 20 *Lactobacillus sp.* tarafından üretilen biyosürfektanlar ile *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumunun engellenmesi ve/veya azaltılması ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle 52 *S. aureus* suşlarının Kongo Kırmızısı katı besi yerinde biyofilm yapma yetenekleri nitel olarak belirlenmiştir. Bakterilerin Kongo Kırmızısı katı besi yerinde siyah renkte koloniler oluşturması biyofilm pozitif, pembemsi renkte koloniler oluşturması ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. 52 *S. aureus* suş arasından sadece yedisinin (26, 36, 38, 43, 55, 56, 60) çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiş ve çalışmada bu bakteriler kullanılmıştır. 20 *Lactobacillus sp.* suş arasından sekizinin (*Lactobacillus acidophilus* BAZ 22, *L. acidophilus* BAZ 51, *L. acidophilus* BAZ 61, *L. brevis* YG 7, *L. rhamnosus* MP 1, *L. rhamnosus* BAZ 78, *Limosilactobacillus fermentum* FKK 3 ve *L. fermentum* LB 16) ürettiği biyosürfektan yedi *S. aureus* suşun oluşturduğu biyofilmi %0,90-%80,60 arasında değişen oranlarda engellemiştir. En fazla engelleyici etki %80,60 oranı ile *S. aureus* 26 suşuna karşı *L. rhamnosus* MP1 suşunun ürettiği biyosürfektanda gözlemlenmiştir. Ancak yapılan çalışmada, laktobasiller tarafından üretilen biyosürfektanların *S. aureus* lara karşı anti-mikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

## Determination of Anti-Biofilm and Anti-Microbial Activities of Biosurfactants Produced by *Lactobacillus* Genus Bacteria

### Highlights

- Biofilms formed by *S. aureus* bacteria cause both significant economic losses in the industry and health problems for humans and animals.
- The application of biosurfactants obtained from probiotic bacteria is an effective and important method in preventing biofilm formation.
- Due to biosurfactant molecules, biodegradability and less toxicity it is more advantageous for many application areas compared to synthetic surfactants.

### Article Info

Received: 03/06/2022

Accepted: 04/08/2022

### Keywords

Lactobacillus sp.,  
Biosurfactant,  
Anti-biofilm,  
Anti-microbial

### Abstract

In this research, it was aimed to prevent and/or reduce biofilm formation and to determine antimicrobial activities of *Staphylococcus aureus* strains with biosurfactants produced by 20 *Lactobacillus sp.* First, the biofilm forming abilities of 52 *S. aureus* strains in Congo Red solid media were qualitatively determined. The formation of black colonies on Congo Red solid medium was evaluated as biofilm positive, and the formation of pinkish colonies as biofilm negative. Among the 52 *S. aureus* strains, only seven (26, 36, 38, 43, 55, 56, 60) were determined to have a very strong (+++) biofilm forming ability, and these bacteria were used in the studies. The biosurfactant produced by eight of the strains (*Lactobacillus acidophilus* BAZ 22, *L. acidophilus* BAZ 51, *L. acidophilus* BAZ 61, *L. brevis* YG 7, *L. rhamnosus* MP 1, *L. rhamnosus* BAZ 78, *Limosilactobacillus fermentum* FKK 3 ve *L. fermentum* LB 16), among the 20 *Lactobacillus sp.*, prevented the biofilm formed by seven *S. aureus* strains at rates ranging from 0.90% to 80.60%. The highest inhibitory effect was observed in the biosurfactant produced by *L. rhamnosus* MP 1 strain against *S. aureus* 26 strain with a rate of 80.60%. But, in the study, it was designated that biosurfactants produced by lactobacilli did not show anti-microbial activity against *S. aureus*.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

\* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zehranur Yüksekdağ, zehranur@gazi.edu.tr

## 1. GİRİŞ

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarit (EPS) matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş hâlde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur [1, 2]. Bakteriler, hayatta kalma mekanizmalarının bir parçası olarak biyofilm oluştururlar [3]. Bakterilerin zorlu ortamlarda yaşaması ve uygun koşullarda üremesi için oluşturulmuş olan bu yapı hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ile sarılmaktadır [4]. EPS, hidrofobik etkileşimler ve iyon köprüleme etkileşimleri yoluyla hem bakterilerin kohezyonuna hem de biyofilmlerin yüzeylere yapışmasına aracılık etmektedir [5]. Bakteriler tarafından üretilen EPS, antibiyotiklerin penetrasyonuna karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyer görevi görmektedir [6]. Bakteriyel biyofilm, bakteri ve EPS'nin basit bir kombinasyonu değil, kimyasal ve fiziksel karmaşıklığa sahip oldukça heterojen ve dinamik bir ekosistemdir [7]. Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir [8]. Anti-mikrobiyal ajanlara herhangi bir direnci bulunmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise yine duyarlı hale dönüşebilmektedir [9].

Bakteriyel adezyon ve biyofilm oluşumu, doğal ve endüstriyel ortamlarda yaygındır ve birçok durumda zararlı etki oluşturmaktadır. Gıda endüstrilerinde, patojenik bakteriler, işleme tesislerinin içinde biyofilm oluşturarak gıda bozulmasına yol açabilir ve tüketicinin sağlığını tehlikeye atabilir [10]. Hastane ortamlarında, biyofilmlerin tıbbi cihaz yüzeylerinde ve hastanın dokularında kalıcı enfeksiyonlara neden olabilmektedir [2, 11]. Kronik enfeksiyonlara, tıbbi implant enfeksiyonlarına ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilen özellikle intravasküler kateterler, idrar sondaları ve ortopedik implant gibi implante tıbbi cihaz gibi çeşitli yüzeylerde kolaylıkla görülebilmektedir [12]. Bakteri hücreleri tıbbi bir malzemenin yüzeyine yapışır, çoğalır ve implante olmuş yüzeyde biyofilm oluşturarak kolonize olur ve bunun sonucunda biyomalzeme ile ilişkili enfeksiyonlar ortaya çıkar [13]. Su ile temas eden tüm yüzeylerde biyofilm tabakasına rastlanılabilir. Ancak steril olma gereksinimi yüksek olan gıda ve petrol endüstrisi için büyük sorun teşkil etmektedir [14, 15].

Biyofilmlerin olumsuz etkilerinin yanısıra faydalı etkileri de bulunmaktadır. Bitki üretimini arttırmak amacıyla fitopatojenlere ve biyogübrelere karşı biyolojik ajan olarak kullanılması [16], korozyonun önlenmesi [17], deniz ekosisteminin korunması [18], tehlikeli kirleticilerin biyolojik olarak iyileştirilmesi [19, 20] gibi yararlı etkileri de yer almaktadır.

Bakteriler, UV radyasyonu, kuruma, sınırlı besinler, aşırı pH ve sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları, yüksek basınç ve antimikrobiyal ajanlar gibi çevresel streslere tepki olarak biyofilmler oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir yüzeye tersinir şekilde bağlanmasıyla başlamaktadır. Bunu da genellikle bakterilerin yapışkan yapılarının ve kısa mesafeli etkileşimlerin yardımıyla geri dönüşü olmayan bağlanma izlemektedir [2, 10]. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve/veya engellenmesi konusu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan biri de mikroorganizmalar tarafından üretilen çeşitli biyosülfektan moleküllerinin biyofilm oluşumunda ve inhibisyonundaki genel rolü üzerine olan çalışmalardır [21-24].

Biyosülfektanlar çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen belirgin yüzey ve emülsifikasyon aktivitelerine sahip, misel agregatları oluşturabilen, amfifilik, sekonder metabolitlerdir [25, 26, 27]. Bu moleküller, farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik göstermekte ve yüzey gerilimini düşürmektedirler [28]. Düşük moleküler ağırlıklı biyosülfektanlar, hava-su ara yüzlerinde yüzey gerilimini ve yağ-su ara yüzlerinde ara yüzey gerilimini azaltırken, yüksek moleküler ağırlıklı biyosülfektan biyoemülgatörler adı verilen su içinde yağ emülsiyonlarının stabilize edilmesinde daha etkili rol oynamaktadır [29]. Üretici mikroorganizmanın fizyolojik fonksiyonlarına göre farklı özelliklere sahip biyosülfektanlar bulunmaktadır. Bunlar; mikroorganizmaların çoğalması esnasında hidrofobik bileşiklerin parçalanmasını sağlama, ağır metalleri parçalama, yüzey gerilimi azaltma, emülsiyon oluşturma, patojen mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını engelleme gibi farklı özelliklere sahip biyosülfektanlardır [30, 31]

Biyosürefektanlar amfifilik yapıları sayesinde mikroorganizmaların hidrofobik yüzeylerine kolaylıkla tutunabilmektedirler [32]. Ayrıca enfeksiyonlu bölgelerde veya katı yüzeylerde patojenik mikroorganizmaların koloni oluşturarak yüzeye tutunmasını engelleyebilmektedirler [25]. Biyosürefektanlar, yüksek biyobozunurluk, düşük toksisite ve çevre dostu gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel olarak farklı alanlarda kullanılabilirler [33]. Biyoremediasyon, yağların geri kazanımı ve endüstriyel emülsifikasyonu arttırmak için kullanılmalarının yanı sıra antibakteriyel, antifungal, antiviral, anti-HIV, anti-inflamatuar immün modülatör aktiviteleri nedeniyle de birçok hastalıkla mücadelede de tedavi edici ajanlar olarak da kullanılabilirler [25, 34]. Tarımsal bağlamda yem sindirilebilirliğini arttırmak, tohumu koruma ve verimliliğini arttırmak, bitki patojen kontrolü, antimikrobiyal aktivite, antibiyofilm aktivitesi, yara iyileşmesi ve dermatolojik bakım ve antikanser tedavileri gibi çeşitli uygulamalarda da yer almaktadırlar [35]. Bilinen anti-mikrobiyal aktiviteye sahip biyosürefektanlar içinde *Bacillus subtilis* suşları tarafından üretilen surfaktin, iturin, fengisin, basillomisin, mikosubtilin [25, 36], *Candida antarctica* tarafından üretilen mannosileritroritol yağları [37], *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipitler [38] ve *Streptococcus thermophilus* A and *Lactococcus lactis* 53 suşlarından izole edilen biyosürefektanların olduğu bildirilmiştir [39, 40].

Bu çalışma kapsamında; 20 laktobasil suşu tarafından üretilen biyosürefektanların 7 *S. aureus* suşlarına karşı anti-biyofilm ve anti-mikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 52 *Staphylococcus aureus* suşu (biyofilm oluşumu için) ve 20 *Lactobacillus* cinsine ait suşlar (biyosürefektan üretimi için) kullanılmıştır.

### 2.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

52 *S. aureus* suşun biyofilm oluşturma özellikleri Kongo Kırmızısı katı besiyeri yöntemi ile belirlenmiştir [41, 42]. Bakteriler Nutrient sıvı besi yerinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen bakteriler Kongo Kırmızısı Katı besi yerine (50 g/L sakkaroz, 37 g/L Brain Heart Infusion Agar ve 0,8 g/L Kongo kırmızısı) tek koloni ekimi yapılarak aynı koşullarda yeniden inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrielerde gelişme gösteren kolonilerinin renkleri incelenmiş ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Siyah ve bordo renkte gözlenen koloniler için biyofilm pozitif, kırmızı, pembe ve beyaz renkte gözlenen koloniler için ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm pozitif kabul edilen bakterilerin koloni rengi siyah ise “çok kuvvetli (+++)”, bordo-siyah ise “kuvvetli (++)”, bordo ise “orta (+)” biyofilm olarak kabul edilmiştir. Tüm bakteriler hem 24 saat sonunda (ön değerlendirme) hem de 48 saat sonunda (asıl sonuç) değerlendirilmiştir. Tüm bakteriler 2 tekrarlı ve 2 paralel olarak çalışılmıştır.

### 2.3. Biyosürefektan Eldesi

Laktobasiller tarafından üretilen biyosürefektanın elde edilmesinde Rodrigues ve arkadaşlarının [40] metodu kullanılmıştır. Bakteriler glukoz yerine aynı oranda laktoz içeren MRS besiyerinde 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 10.000 devirde, 10°C'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kültürler 2 kez PBS (fosfat tamponlu tuz, 0,01 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0,15 mol/L NaCl, pH 7,0) tamponuyla yıkanarak yeniden süspansiyon edilmiştir. Biyosürefektanın serbest kalması için, süspansiyon hafifçe çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra, bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması için yeniden santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatant 0,22 mikrometre filtreden (Sigma-Aldrich) süzülerek diyaliz membranı (moleküler ağırlığı 6000-8000 Dalton) ile diyaliz edilmiştir.

## 2.4. Anti-Biyofilm Etki

20 *Lactobacillus* sp. suşları tarafından üretilen biyosümfektanların, çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturan 7 *S. aureus* (26, 36, 38, 43, 55, 56, 60) suşun ürettiği biyofilmi engelleme yüzdeleri Heinemann ve ark. [43] ve Stepanovic ve ark. [44] metotları modifiye edilerek belirlenmiştir. Laktobasiller tarafından üretilen biyosümfektanlar 96 kuyucuklu mikropklara 200 µL eklenmiş ve +4°C’de 18 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde her bir kuyucuğuna yoğunluğu 0,05 OD’ye ayarlanan *S. aureus* kültürlerinden 200 µL eklenmiştir. Plate kapağı kapalı şekilde 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak PBS içeren kuyucuklar kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği boşaltılmış her bir kuyucuk üç kez steril PBS tamponu ile yıkanmıştır. Her yıkama aşamasından sonra kuyucuklar boşaltılmış ve mikropklalar ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Yıkama işleminden sonra, yapışan bakterilerin kalıntısını gidermek amacıyla 200 µL metanol (Merck) ile 20 dakika fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Mikropklalar boşaltılıp gece boyunca ters pozisyonda oda sıcaklığında havada kurumaya bırakılmıştır. Her bir mikropkale kuyucuğu 200 µL kristal viyole ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek boyanmıştır. Boya fazlası çekilmiş ve geri kalan kısımdan boya temizlenene kadar su altına yıkama işlemi uygulanmıştır. Ardından mikropklalar oda sıcaklığında ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Hücrelere bağlanan boyanın geri çözülmesi için, her kuyucuktaki boya 200 µL %33’lük glasiyel asetik asit (Merck) ilave edilmiştir. Glasiyel asetik asit kuyucukların hem tabanına hem de duvarlarına yapışan bakterilerin dolaylı ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Havayla teması önlemek için mikropklaların kapakları kapatılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika çalkalamaksızın bekletilmiştir. Her bir kuyucuktaki optik yoğunluk (OD) 570 nm’de ölçüm yapılarak belirlenmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak yüzde anti-biyofilm oranları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Mikrobiyal inhibisyon} = [1 - (A_c/A_0)] * 100$$

A<sub>c</sub>: Biyosümfektan absorbe edilen kuyucukların biyofilm OD değerleri.

A<sub>0</sub>: Biyosümfektansız kuyucukların biyofilm OD değerleri (Kontrol grubu)

Biyofilm oluşumundaki fenotipik ifadenin *in vitro* koşullarda değişmeye uygun olması nedeniyle, hataları minimize etmek ve bilgilerin güvenilirliğini sağlamak amacıyla, her bir suş için üç tekrarlı ve her bir test için 2 paralelli denemeler yapılmıştır.

## 2.5. Anti-Mikrobiyal Etki

Laktobasillerden elde edilen biyosümfektanların, çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturan 7 *S. aureus* suşlarına karşı anti-mikrobiyal aktiviteleri hem disk difüzyon hem de agar difüzyon yöntemleri ile test edilmiştir. Agar difüzyon tekniğinde Nutrient agarlı petri kaplarına açılan kuyucuklara her bir bakteriye ait 200 µL biyosümfektan aktarılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuk etrafında oluşan zon çapları dijital kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür [45].

Disk difüzyon tekniğinde ise standart, 5 mm çapında, steril ve boş antibiyogram diskleri 2,5-3 cm aralıklarla 0,5 McFarland bulanıklılığına ayarlanan *S. aureus* suşlarının yayıldığı Nutrient agar plakların üzerine yerleştirilmiştir. 20 µL biyosümfektanın antibiyogram disklere emdirilmesinin ardından 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları mm olarak ölçülmüştür [46, 47].

## 3. BULGULAR

Bu çalışmada, *Lactobacillus* kültürleri tarafından üretilen biyosümfektanların, *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumunu engellenmesi (anti-biyofilm) ve *S. aureus* bakterilerinin gelişimini inhibe etmesinin (anti-mikrobiyal) belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan 52 *S. aureus* suşudan yedisinin (26, 36, 38, 43, 55, 56 ve 60) biyofilm yapma oranları çok kuvvetli (+++), on beşinin kuvvetli (++) ve on birinin de orta (+) seviyede olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan suşlardan 19’unda herhangi bir biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 1).

Çalışmada kullanılan 20 laktobasil içerisinden 8 suştan elde edilen biyosürefektanın, biyofilm yapma oranı çok kuvvetli olan *S. aureus* suşları tarafından üretilen biyofilm için farklı oranlarda engelleyici etki gösterdikleri belirlenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* BAZ 22 için %1,60-%56,60, *L. fermentum* FKK3 için %43,90-%67,60, *L. acidophilus* BAZ 51 için %26,80-%44,00, *L. brevis* YG7 için %0,90-%45,20, *L. rhamnosus* MP1 için %39,20-%80,60, *L. fermentum* LB 16 için %1,30-%49,10, *L. rhamnosus* BAZ 78 için %24,30-%61,60 ve *L. acidophilus* BAZ 61 için %4,40-%52,40 aralıklarında değişen yüzdelerde anti-biyofilm etki göstermişlerdir (Çizelge 2, Şekil 1). Geriye kalan 12 suşun bazılarının biyofilm oluşumunu engelleyici etki gösterdiği, bazılarının etki göstermediği tespit edilmiştir.

Çizelge 1. *S. aureus* suşlarının nitel biyofilm oluşturma özelliği

<i>Suşlar</i>	<i>Biyofilm Oluşumu</i>	<i>Suşlar</i>	<i>Biyofilm Oluşumu</i>	<i>Suşlar</i>	<i>Biyofilm Oluşumu</i>
<i>S. aureus</i> 1	+	<i>S. aureus</i> 26	+++	<i>S. aureus</i> 44	++
<i>S. aureus</i> 2	-	<i>S. aureus</i> 27	-	<i>S. aureus</i> 45	++
<i>S. aureus</i> 3	++	<i>S. aureus</i> 28	+	<i>S. aureus</i> 46	++
<i>S. aureus</i> 4	-	<i>S. aureus</i> 29	+	<i>S. aureus</i> 47	+
<i>S. aureus</i> 5	-	<i>S. aureus</i> 30	-	<i>S. aureus</i> 48	+
<i>S. aureus</i> 6	-	<i>S. aureus</i> 31	++	<i>S. aureus</i> 49	
<i>S. aureus</i> 7	-	<i>S. aureus</i> 32	-	<i>S. aureus</i> 50	++
<i>S. aureus</i> 8	-	<i>S. aureus</i> 33	-	<i>S. aureus</i> 52	-
<i>S. aureus</i> 9	-	<i>S. aureus</i> 34	-	<i>S. aureus</i> 53	-
<i>S. aureus</i> 10	-	<i>S. aureus</i> 35	++	<i>S. aureus</i> 54	++
<i>S. aureus</i> 11	++	<i>S. aureus</i> 36	+++	<i>S. aureus</i> 55	+++
<i>S. aureus</i> 12	++	<i>S. aureus</i> 37	-	<i>S. aureus</i> 56	+++
<i>S. aureus</i> 20	+	<i>S. aureus</i> 38	+++	<i>S. aureus</i> 57	+
<i>S. aureus</i> 21	++	<i>S. aureus</i> 39	++	<i>S. aureus</i> 58	+
<i>S. aureus</i> 22	-	<i>S. aureus</i> 40	++	<i>S. aureus</i> 59	+
<i>S. aureus</i> 23	+	<i>S. aureus</i> 41	++	<i>S. aureus</i> 60	+++
<i>S. aureus</i> 24	++	<i>S. aureus</i> 42	-		
<i>S. aureus</i> 25	-	<i>S. aureus</i> 43	+++		

-: biyofilm oluşumu gözlenmemiş

+: orta

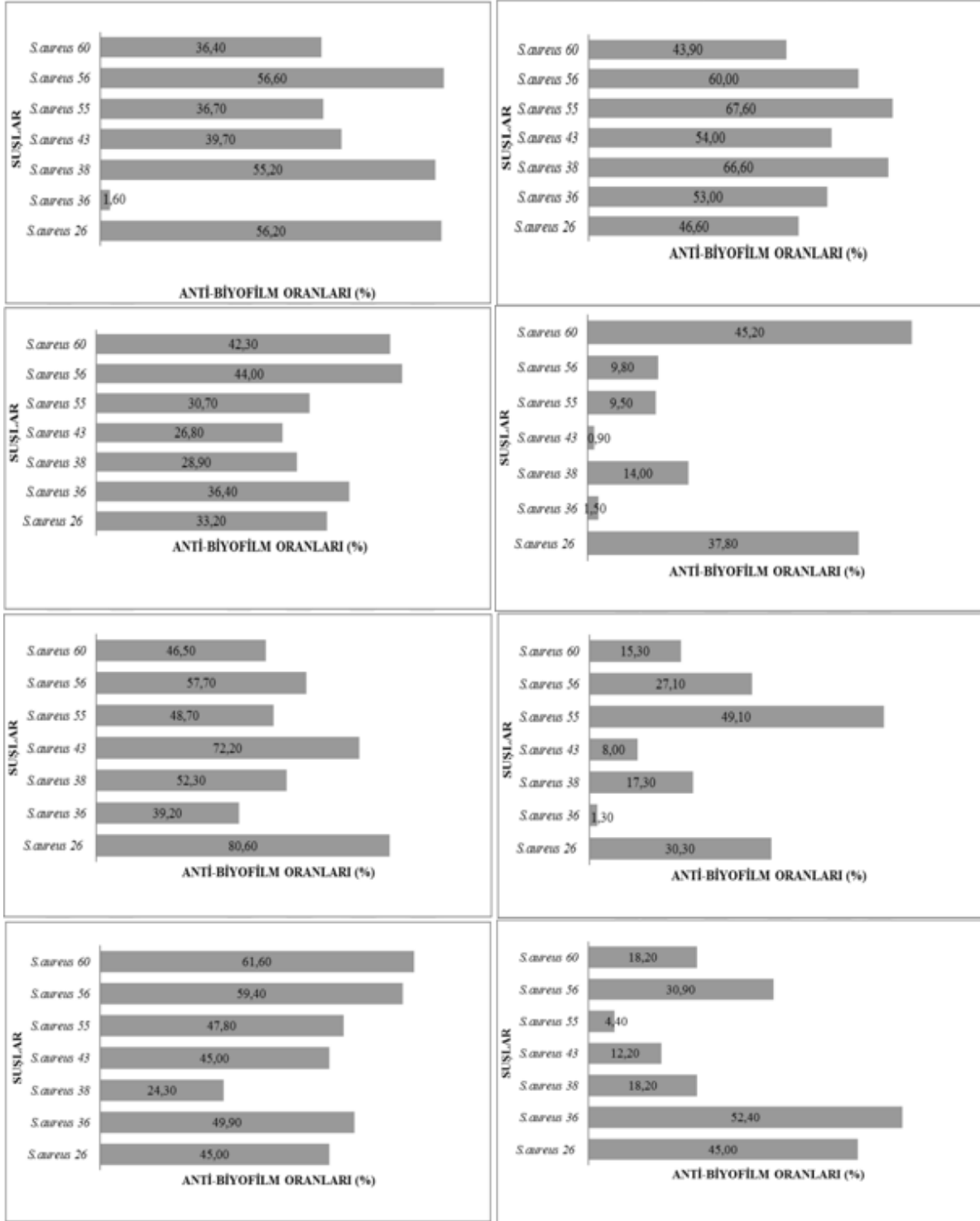
++: kuvvetli

+++ : çok kuvvetli

**Çizelge 2.** Lactobacillus suşlarından elde edilen biyosüpfektanların S. aureus suşlarına karşı anti-biyofilm oranları (%)

Lactobacillus suşları	S. aureus						
	26	36	38	43	55	56	60
BAZ 59	45,20±0,10	21,80±0,20	-17,20±0,10*	-2,30±0,10*	30,70±0,10	30,70±0,05	-33,20±0,05*
LB 17	29,50±0,35	44,30±0,70	-10,80±0,10*	6,70±0,00	-13,10±0,10*	54,30±0,15	17,80±0,10
BTM1	39,20±0,10	-20,00±0,00*	-23,50±0,00*	27,10±0,05	4,60±0,10	26,70±0,15	-2,60±0,00*
BTM3	32,70±0,05	5,80±0,20	-78,40±0,20*	-18,20±0,10*	39,80±0,10	16,80±0,10	-44,80±0,20*
BAZ 36	39,10±0,05	44,80±0,10	-59,70±0,20*	16,00±0,20	41,80±0,10	-19,10±0,10*	35,40±0,05
ATCC 4356	-3,40±0,00*	8,90±0,10	40,50±0,20	34,80±0,10	12,50±0,20	34,10±0,15	21,60±0,20
KIR3	-40,80±0,20*	-29,90±0,00*	-140,20±0,10*	-89,50±0,00*	-90,00±0,40*	18,70±0,35	23,60±0,10
EDS4	-71,60±0,05*	41,90±0,15	27,10±0,20	43,80±0,35	27,90±0,20	1,90±0,20	20,80±0,35
SMÇ6	47,00±0,05	48,90±0,10	12,20±0,20	26,60±0,20	13,10±0,20	50,70±0,15	-29,00±0,20*
BAZ 54	47,00±0,20	24,60±0,05	35,10±0,10	28,70±0,20	36,70±0,15	23,30±0,15	-8,10±0,00*
IP5	11,90±0,20	7,20±0,20	9,70±0,15	8,30±0,15*	-4,70±0,05*	-6,80±0,20*	35,00±0,00
ZYN 17	26,20±0,40	29,00±0,20	21,40±0,20	-44,70±0,05*	30,50±0,10	-80,60±0,20*	34,60±0,10
BAZ 22	56,20±0,20	1,60±0,05	55,20±0,20	39,70±0,20	36,70±0,70	56,60±0,40	36,40±0,60
FKK3	46,60±0,20	53,00±0,15	66,60±0,20	54,00±0,20	67,60±0,35	60,00±0,05	43,90±0,15
BAZ 51	33,20±0,60	36,40±0,05	28,90±0,20	26,80±0,15	30,70±0,40	44,00±0,10	42,30±0,10
YG7	37,80±0,20	1,50±0,10	14,00±0,05	0,90±0,05	9,50±0,05	9,80±0,20	45,20±0,00
MP1	80,60±0,05	39,60±0,10	52,30±0,20	72,20±0,15	48,70±0,40	57,70±0,15	46,50±0,05
LB 16	30,30±0,05	1,30±0,15	17,30±0,15	8,00±0,10	49,10±0,20	27,10±0,00	15,30±0,10
BAZ 78	45,00±0,20	49,90±0,20	24,30±0,20	45,00±0,10	47,8±0,40	59,40±0,15	61,60±0,10
BAZ 61	45,00±0,05	52,40±0,05	18,20±0,00	12,20±0,05	4,40±0,00	30,90±0,20	18,20±0,15

\*: Biyofilm oluşumunu artırıcı yönde etki



**Şekil 1.** *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen biyosüpfektanın *S. aureus* suşları üzerindeki % anti-biyofilm oranları

- a) *L. acidophilus* BAZ 22 b) *L. fermentum* FKK3 c) *L. acidophilus* BAZ 51 d) *L. brevis* YG 7  
e) *L. rhamnosus* MP 1 f) *L. fermentum* LB16 g) *L. rhamnosus* BAZ 78 h) *L. acidophilus* BAZ 610

Bu çalışmada, *Lactobacillus* sp. suşlarının ürettiği biyosürfektanın çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturan *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesine yönelik analizler yapılmıştır. İki farklı yöntem (disk difüzyon ve agar difüzyon) ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında biyosürfektanların etkili sonuç gösteremediği ve Stafilakokların üremesini engelleyemediği gözlenmiştir.

#### 4. TARTIŞMA

Biyosürfektanlar glikolipid, lipopeptit, polisakarit-protein kompleksi, fosfolipit, yağ asitleri ve nötr lipidleri içeren amfipatik bileşiklerdir [48]. Bakterisidal, bakteriyostatik, biyofilm oluşumunun inhibisyonu, biyofilm bozulması, sinerjistik ve adjuvan etkiler (sekonder tümör oluşumunun baskılama) gibi çeşitli uygulamalarda etkin olarak kullanılmaktadırlar [35].

Biyosürfektanlar yüksek biyobozunurluk ve çevre dostu özellikleri nedeniyle endüstriyel olarak çeşitli alanlarda kullanılabilirler. Birçoğunun insan konakçılara karşı düşük toksisite ve yüksek pH, sıcaklık koşullarına dayanıklılık özellikleri bulunmaktadır [33]. Ayrıca, yüzey aktif bileşikler, anti-viral, anti-kanser, anti-HIV, anti-inflamatuar, immün modülatör ve antimikrobiyal aktiviteler gibi farklı aktiviteler sergileyebilirler [34, 49] ve patojenlere karşı anti-adhesiv (antibiyofilm) ajanlar olarak kullanılabilirler [50]. Bu anlamda biyosürfektanların probiyotik bakteriler tarafından serbest bırakılması ürogenital ve gastrointestinal sistemdeki kolonize olmuş diğer suşlar için bir silah olarak kabul edilmektedir [51]. Biyosürfektanların, silikon [52], titanyum [53] ve polistiren plakalar [54] gibi yüzeylerde biyofilm oluşumunu engellediği ve/veya azalttığı bildirilmiştir. Biyosürfektanların, önleyici ajan olarak kullanılabilirliği; kateter ve diğer cerrahi malzemeler üzerinde patojenik biyofilm oluşumunun başlangıcını geciktirmesi nedeniyle sentetik ilaç ve kimyasal kullanımının azaltılabileceği bildirilmiştir [31, 50, 55].

Laktobasillerden biyosürfektan üretimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; inokulum boyutu, pH, sıcaklık, ajitasyon hızı, inkübasyon süresi, oksijen varlığı ve kültür ortamı bileşimini içermektedir [27]. Süt ürünleri, anne sütü, fermente karides ve meyvelerden izole edilen *L. acidophilus*, *L. pentosus* ve *L. fermentum* antimikrobiyal aktiviteye sahip hücresiz biyosürfektan ürettikleri, Laktik asit bakterisi olan *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 suşunun *Bacillus cereus*, *E. aerogenes* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip hücreye bağlı bir lipoprotein ürettiği rapor edilmiştir [56]. Madhu ve Prapulla [57] *L. plantarum* CFR2194 tarafından üretilen glikoprotein biyosürfektanının *S. aureus*'un yapışmasını engellediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada aynı patojenin *L. agilis* tarafından üretilen biyosürfektan ile yüzeye yapışmasının inhibe edildiği bildirilmiştir [48]. Ayrıca araştırmacılar, biyosürfektan üreten suşun yapışma önleyici özelliklerinin, mikroorganizmanın büyüdüğü ortamdaki karbon kaynağından da etkilenebileceğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle, mikrobiyal biyosürfektanların polimerik fraksiyonlarında bulunan karbonhidrat, lipid ve protein oranındaki değişiklikler biyolojik etkinliklerinde de önemli rol oynayabilmektedir [35]. *Lactobacillus*lar, temel olarak protein, polisakarit ve fosfattan oluşan biyosürfektanları farklı oranlarda üretebilmektedirler ve bunlar temel olarak glikolipid veya glikolipoprotein olarak sınıflandırılmaktadır [49, 58].

LAB tarafından üretilen biyosürfektanlar ile ilgili çalışmalar, *Bacillus* türleri tarafından üretilen lipopeptidler ve *Pseudomonas* türleri tarafından üretilen rhamnolipidler gibi diğer biyosürfektanlara kıyasla daha az bulunmaktadır. Bunun sebebi; daha az etkili olmaları, yüzey gerilimini 36-45 mN/m civarında değerlere düşürmeleri; kritik misel konsantrasyonlarının (cmc) nispeten yüksek olması (1,0 ila 20,0 mg/mL) nedeniyle geri kazanımları için bir ekstraksiyon işlemine ihtiyaç duyulmasıdır [48]. Ancak LAB tarafından üretilen biyosürfektanlar genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edildiklerinden dolayı birçoğu gıda üretimi ve endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır.



Bu araştırmada, 20 *Lactobacillus* sp. suşunun biyosürfaktan üretim kapasitesi belirlenmiştir. Üretilen biyosürfektanların *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumunu engellemesi ve/veya azaltılmasını belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından *S. aureus* patojenine karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Stafilokokların, çeşitli yüzeylere yapışabilme ve biyofilm oluşturabilme özelliklerinin olduğu bilinmektedir. *S. aureus* bakterilerinin oluşturdukları biyofilmler hem endüstride önemli ekonomik kayıplara hem de tıp alanında sağlık problemlerine yol açmaktadır. *S. aureus* suşları insan ve hayvanlar için çok sayıda enfeksiyonlara (iltihaplı yaralar, septisemi, menenjit, mastitis, enzootik piyemi) neden olan fırsatçı patojen mikroorganizmalardır [59]. Stafilocoklar, adheransı kolaylaştıran “slime” (slaym, biyofilm) oluşturabilme yeteneğine sahip oldukları için biyomateryalleri kaplayan biyofilm oluşturma etkileri daha kolay olmaktadır. Bakteriye fagositozdan koruyan, nötrofillerin etkisini önleyen ve lenfosit aktivitesini azaltan slaym yapısını üretebilen suşların anti-bakteriyal tedaviye daha dirençli oldukları bildirilmiştir [60, 61].

Bu çalışmada, *Lactobacillus* kültürleri tarafından sentezlenen biyosürfektanların, patojenlerin yüzeye tutunmayı engellemeye yönelik aktivitesinin *S. aureus* bakterilerine karşı kullanılabilirliğinin ve patojen mikroorganizmanın gelişimini engelleme etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre 52 *S. aureus* suşu içerisinde 33’ünde farklı oranlarda (çok kuvvetli, kuvvetli, orta) biyofilm oluşturma yeteneği gözlenirken, 19’unda herhangi bir biyofilm oluşumu tespit edilememiştir (Çizelge 1).

Votava ve Woznicova [62] kan kültüründen izole ettikleri 32 *S. aureus* suşundan 18’inin (%56,2) biyofilm oluşturma kapasitesinin pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada bilateral konjonktivitli soft kontakt lens kullanan kişilerin sürüntü örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının %61,1’inde biyofilm üretimi tespit edilmiştir [63]. *Ica* (intersellüler adezyon) operonunu kodlayan enzimler tarafından, polisakkarit intersellüler adezin (PIA) üretimi, stafilocoklardaki biofilm oluşumunun en iyi bilinen mekanizmasıdır. PIA, *ica operon bölgesinde bulunan icaA, icaD, icaB ve icaC* genlerinin ürünüdür ve biofilm oluşumu esnasında hücreler arası iletişimi sağlamaktadır. *IcaADBC* hem *Staphylococcus aureus*, hem *S. epidermidis*’te bulunan bir operondur. Özellikle *icaA* ve *icaD* biyofilm genleri, *S. aureus* ve *S. epidermidis*’deki slime üretiminde etkin role sahiptir [64, 65]. Cucarella ve diğerlerinin [66] çalışmasında, sığır mastitinden izole edilen 195 *S. aureus* suşu içerisinde 184’ü (%94,36) *icaADBC* pozitif bulurken, 50’sinin (%25,60) *BAP* pozitif olduğu bildirilmiştir. *BAP* pozitif izolatların hepsinde *ica* genleri pozitif olarak tespit edilmiştir. Hem *IcaADBC* hem de *BAP* pozitif olanların daha güçlü biyofilm oluşturdukları bildirilmiştir. Rohde ve arkadaşları ise fenotipik olarak biyofilm pozitiflik ile *icaA* ve *icaD* genlerinin arasında tam uyumluluk olmadığını savunmaktadırlar [67]. Arciola ve arkadaşları [41] protez enfeksiyonlarından elde ettikleri 15 *S. aureus* suşundan 11 tanesinde (%73,0) biyofilm üretimi gözlemlemişlerdir. Biyofilm pozitif suşların hepsinde *icaA* ve *icaD* genleri tespit edilmiş, ancak biyofilm negatif suşlarda bu genler tespit edilmemiştir. Şahin ve Kaleli [68] araştırmalarında *S. aureus* izolatlarında biyofilm üretiminden sorumlu olan *icaA, icaD* genleri ve ürünleri arasındaki ilişkiyi belirlemişler ve *S. aureus* izolatlarında biyofilm oluşturma düzeyinin yüksek olduğunu (yaklaşık %80), *icaA* ve *icaD* genleri ve ürünlerinin (PIA/PNAG) biyofilm oluşumunda rol oynadıklarını rapor etmiştir. Negatif biyofilm oluşturan *S. aureus* suşlarının, biyofilm oluşumundan sorumlu olan genlere sahip olmadığı düşünülmektedir. Ancak çalışma kapsamında biyofilm oluşumundan sorumlu tutulan genler araştırılmadığından doğrudan bir ilişkisi olup olmadığı tespit edilememiştir.

Biyosürfektanların; anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-tümör, anti-mikoplasmik, anti-viral, insektisidal ve anti-biyofilm (anti-adheziv) özellikler sergiledikleri belirlenmiştir [34, 49]. Bu moleküller çoklu ilaç dirençli bazı patojenlere karşı potansiyel ilaç molekülleri olarak değerlendirilmiştir [69]. Biyosürfektan molekülleri, biyolojik bozunabilirlik ve daha az toksisite içermesi nedeniyle sentetik sürfektanlara kıyasla birçok biyomedikal uygulama için daha fazla avantaj sağlamaktadır [70, 71]. Tüketicilerin sağlıklı ve doğal ürünlere olan ilgisinin artmasıyla birlikte yeni ve doğal anti-mikrobiyalere duyulan ihtiyaç da artış göstermiştir. Bunlar arasında biyosürfektanlar doğal alternatifler arasında yer almaktadır [72]. Analiz

sonuçlarına göre tüm suşların anti-biyofilm sonuç aralıkları %-140,2-80,6 değerleri arasında bulunmuştur (Çizelge 2). Negatif çıkan sonuçlar biyofilm oluşumunu artırdığı yönünde değerlendirilirken, pozitif çıkan sonuçlar biyofilm oluşumunu azalttığı yönünde değerlendirilmiştir [43, 44]. Gudiña ve diğerleri [73] biyosürfektanın, anti-biyofilm etkisinin test edilen mikroorganizmaya ve biyosürfektan konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği bildirmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda laktobasil suşlarından elde edilen biyosürfektanların biyofilm oluşumunu engellememesi yani sonuçların negatif çıkması, kullanılan biyosürfektan miktarının (200 µL) yeterli gelmediğini ve/veya test edilen *S. aureus* suşuna göre değiştiğini düşündürmektedir. Biyosürfektanın anti-biyofilm etkisinin aynı türün farklı suşlarına karşı bile değişebileceği bildirilmiştir [74]. Çalışmamızda da, *L. acidophilus* BAZ 22 tarafından üretilen biyosürfektanın, *S. aureus*'un farklı suşlarına karşı anti-biyofilm etkisi incelenmiştir. Buna göre; *S. aureus* 26,36,38,43,55,56 ve 60 için sırasıyla %56,20; 1,60; 55,20; 39,70; 36,70; 56,60 ve 36,40 anti-biyofilm etki oluşturduğu belirlenmiştir. Tüm *Lactobacillus* suşları içerisinde *L. rhamnosus* MP1 suşundan elde edilen biyosürfektanın *S. aureus* 26 suşu tarafından üretilen biyofilm oluşumunu %80,6 oranı ile en fazla engellediği belirlenmiştir (Çizelge 2). *S. aureus* 36 suşu tarafından üretilen biyofilm *Lactobacillus* biyosürfektanlarının %90'ından etkilenmiş ve biyofilm oluşumu azalmıştır. Yalnız *L. rhamnosus* BTM1 ve *L. brevis* KIR3 suşları tarafından üretilen biyosürfektanların, *S. aureus* 36 suşunun oluşturduğu biyofilmin oluşumuna engelleyici özellik göstermediği tespit edilmiştir. *L. brevis* KIR3 suşundan elde edilen biyosürfektanın sadece *S. aureus* 56 ve *S. aureus* 60 suşlarının oluşturduğu biyofilmi sırasıyla, %18,7, %23,6 oranında engellediği tespit edilmiştir. Diğer *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumuna engelleyici özellik göstermediği aksine biyofilm oluşumunu artırıcı yönde etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Biyosürfektanların yapışma önleyici aktivitesi, özellikle biyofilm oluşumunu engellemek için oldukça önemlidir [10]. Çünkü biyofilm oluşumu hem patojenik hem de patojen olmayan mikroorganizmaların yüzeye bağlanmasında ve canlı kalabilmesinde önemli rol oynamaktadır [75]. Ayrıca mikroorganizmaya ilaç toleransı, konakçı bağışıklık tepkilerinden kaçınma ve enfeksiyonun tekrarlanması gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır [35]. Çalışmamızda kullanılan biyosürfektanların *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Gudiña ve diğerlerinin [73] çalışmasında *Lactococcus paracasei* subsp. *paracasei* A20 suşu tarafından üretilen biyosürfektanın, 18 mikroorganizmaya karşı anti-mikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bütün mikroorganizmalar için, düşük biyosürfektan konsantrasyonlarında (3,12 mg/mL; 6,25 mg/mL; 12,50 mg/mL; 25,00 mg/mL) bile anti-mikrobiyal aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca artan biyosürfektan konsantrasyonuyla birlikte büyüme inhibisyon yüzdelerinde de artış gözlemlendiği tespit edilmiştir. En yüksek biyosürfektan konsantrasyonunda (50 mg/mL) *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* karşı düşük anti-adhesiv özellik gözlenirken, aynı konsantrasyonda biyosürfektanın suşlara karşı sırasıyla %100, %100, %91,50 anti-mikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda anti-biyofilm ve anti-mikrobiyal aktivitenin birbiri ile uyumlu olmadığı bildirilmişlerdir. Başka bir çalışmada, *L. plantarum* CFR 2194 suşu tarafından üretilen biyosürfektanın, *Escherichia coli* ATCC 31075, *E. coli* MTCC 108, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica* MTCC 859 ve *S. aureus* F722 suşlarına karşı anti-mikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. 4 mg/mL konsantrasyonda biyosürfektanın *E. coli* ATCC 31075, *S. typhi* ve *Y. enterocolitica* MTCC 859 gelişimini inhibe edemediği gözlenmiştir. *E. coli* MTCC108 için 5-10 mm çapı civarında, *S. aureus* F 722 için ise yaklaşık 5 mm çapında inhibisyon zonu olduğu bildirilmiştir. Biyosürfektan konsantrasyonunun 25 mg/mL'ye getirildiği durumda ise, *S. typhi*'nin gelişiminin inhibe edilemediği ve *E. coli* ATCC 31075, *Y. enterocolitica* MTCC 859, *S. aureus* F722 ve *E. coli* MTCC 108 için sırasıyla 5 mm, 5-10 mm, 5-10 mm ve 15 mm'den fazla inhibisyon zonu çapının gözlemlendiği bildirilmiştir [57].

Biyosürfektanlar moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılıp mikrobiyal kökenlerine ve kompozisyonlarına göre kategorize edilmektedirler. Yüksek moleküler ağırlıklı biyosürfektanlar, lipopolisakaritleri içerir. Ancak asıl ilgi alanları, düşük moleküler ağırlıklı glikolipitler ve lipopeptitler (LP'ler) ve fosfolipitlerdir. LP'ler, peptit zincirine bağlı lipit parçalarından oluşan ve antimikrobiyal aktivite gibi biyolojik aktivitelere sahip yapılardır. LP'ler, negatif yüklü hücre zarlarını içeren lipite zarar verebilir ve/veya nüfuz edebilir. Polar elementin çözünürlüğü korumaya çalışmasının bir sonucu olarak hücre yüzeyi ara yüzünde bir yük dengesizliği gelişebilmektedir. Bu durum, Gram-negatif bakterilerin lipid içeren hücre zarında hücre hasarına/ölümüne neden olan ve gözenek oluşumuna yol açan hücre morfolojisi kaybına neden olmaktadır.

[35]. *Pseudomonas*'tan türetilen ve glikolipit çeşidi olan ramnolipitlerin antimikrobiyal özelliği, bakteri hücre plazma zarının bozulmasına yol açan geçirgenleştirici etkilerine, hücre yüzey yükünü tehlikeye atma yeteneklerine ve bakteri hücresi hidrofobikliğini değiştirme yeteneklerine atfedilmiştir [76, 77]. Ayrıca biyofilm oluşumunu önleme ve engelleme yeteneğine sahip olan ramnolipitlerin, kurucu bakterileri antimikrobiyal maddelere karşı daha duyarlı hale getirdikleri bildirilmiştir [78]. LAB'den türetilen biyosülfektanların kimyasal bileşimi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak biyosülfektanların kimyasal bileşimi üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan suş tipine bağlı olarak glikolipitler, glikoproteinler veya fosfat gruplarıyla bağlantılı proteinlerin ve polisakkaritlerin çok bileşenli karışımları gibi farklı bileşenlerden oluştukları bildirilmiştir [79]. Çalışmamızda, antimikrobiyal aktivitenin hiç gözlenmemiş olması; kullanılan bakterilerin izolasyon kaynaklarının ve gelişme ortamlarında kullanılan karbon kaynaklarının farklı olması, düşük konsantrasyonlarda (inhibisyon için yetersiz) biyosülfektan kullanılması, kullanılan bakterinin cinsine göre üretilen biyosülfektan çeşidinin farklı olması ya da patojen bakterinin kullanılan biyosülfektana karşı dirençli olması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız literatür taramaları neticesinde çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların tarafından üretilen biyosülfektanların, patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapısını engellemede etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmada, *Lactobacillus* cinsi bakterileri tarafından üretilen ve toksisitesi, kimyasal yapısının aydınlatılması konusunda yeterli kanıt bulunmayan biyosülfektanlar ile *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumunu engelleme ve/veya azaltma etkisi tespit edilmiştir [80]. Laktobasil tarafından üretilen biyosülfektanların absorpsiyon uygulaması, *S. aureus* biyofilmlerinin kontrolünde, gıda sanayinde uygulanan klor gibi çevre ve canlılar için toksik etkileri olan kimyasallara alternatif olabilecektir. Ayrıca laktobasil suşları tarafından üretilen biyosülfektanın hastane kökenli patojen *S. aureus* bakterilerini azaltmak için biyomedikal ekipmanlarda biyolojik koruyucu kaplamalar olarak da kullanılabilmesi düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında, 2017 yılında tamamlanan “*Lactobacillus* Cinsi Bakterilerde Biyosülfektan Üretimi ve Biyosülfektanın *Staphylococcus aureus* Bakterilerinin Oluşturduğu Biyofilmi Engellemesi” isimli yüksek lisans tezinden türetilmiştir. Berat Çınar Acar, çalışmanın deneysel aşamalarında ve makalenin yazılmasında sorumluluk almıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Tremblay, Y.D., Levesque, C., Segers, R.P., Jacques, M. (2013). Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Veterinary Research*, 9, 213.
- [2] Muhammad, M.H., Idris, A.L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., Huang, T. (2020). Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928.
- [3] Vestby, L.K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L.L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.
- [4] Jayathilake, G., Jana, P.S., Rushton, S., (2017). Extracellular polymeric substance production and aggregated bacteria colonization influence the competition of microbes in biofilms. *Frontier in Microbiology*. 11, 698.
- [5] Costa, O.Y.A., Raaijmakers, J.M., Kuramae, E.E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontier in Microbiology*, 9, 1636.
- [6] Del Pozo, J.L., Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 82(2), 204-209.
- [7] Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 661-671.
- [8] Szczuka, E. and Kaznowski A. (2014). Antimicrobial activity of tigeicycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiologica (Praha)*, 59(4), 283-8.

- [9] Ceçe, E.N. (2011). Staphylococcus epidermidis biyofilmlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyofajların izolasyon ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 16-23.
- [10] Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E.M., Villar, C.J., Lombo, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontier in Microbiology*, 9, 898.
- [11] Percival, S.L., Suleman, L., Vuotto, C., Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance, and control. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 323-334.
- [12] Bi, Y., Xia, G., Shi, C., Wan, J., Liu, L., Chen, Y., Wu, Y., Zhang, W., Zhou, M., He, H., Liu, R. (2021). Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Research*, 1(2), 193-212.
- [13] Francolini, I., Donelli, G. (2010) Prevention and control of biofilm-based medical device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 227-238.
- [14] Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 9(18), 1049-1056.
- [15] Kavanaug, N.L. and Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057-61.
- [16] Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A.C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8:49.
- [17] Martinez, P., Vera, M., Bobadilla-Fazzini, R.A. (2015). Omics on bioleaching: Current and future impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8337-8350.
- [18] Naidoo, S., Olaniran, A.O. (2013). Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 249-270.
- [19] Ali, J., Sohail, A., Wang, L., Rizwan Haider, M., Mulk, S., Pan, G. (2018). Electro-microbiology as a promising approach towards renewable energy and environmental sustainability. *Energies*, 11(7), 1822.
- [20] Irankhah, S., Abdi Ali, A., Mallavarapu, M., Soudi, M.R., Subashchandrabose, S., Gharavi, S., Ayati, B. (2019). Ecological role of *Acinetobacter calcoaceticus* GSN3 in natural biofilm formation and its advantages in bioremediation. *Biofouling*, 35(4), 377-391.
- [21] Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Banat, I.M., Sangshetti, J.N., Patil, R.H., Gade, W.N. (2016). Multiple roles of biosurfactants in biofilms. *Current Pharmaceutical Design*, 22(11), 1429-448.
- [22] Díaz De Rienzo, M.A., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I.M., (2016). Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2), 1-8.
- [23] Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H., Ge, J. (2019). Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*, 127, 12-20.
- [24] Mishra, R., Panda, A.K., Mandal, S.D., Shakeel, M., Bisht, S.S., Khan, J. (2020). Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. *Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 11, 1-23.
- [25] Yuliani, H., Perdani, M.S., Savitria, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarkob, A., Hermansyah, H. (2018). Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *5th International Conference on Energy and Environment Research*, 153, 274-278.
- [26] Ghasemi, A., Moosavi-nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., Yousefi, G. (2019). Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization. *Scientific Reports*, 9, 5287.
- [27] Mouafo, H.T., Sokamte, A.T., Mbawala, A., Ndjouenkeu, R., Devappa, S. (2022). Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization and food application. *Food Bioscience*, 46, 101598.
- [28] Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P. (2006). Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*. 24(6), 604-620.
- [29] Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427-444.
- [30] Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4): 229-236.
- [31] Singh, P. and Cameotra, S.S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, 22(3), 142-146.
- [32] Özden, D. (2021). Plastik biyodegradasyonu: Genel sorunlar ve biyoteknolojik çözümler. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(2), 324-339.
- [33] Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 401.

- [34] Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M. T., and Alexandrisis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061.
- [35] Naughton, P.J., Naughton, R.M.V., Banat, I.M. (2019). Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, 127, 12-28.
- [36] Hussain, T., Khan, A.A., Mohamed, H.I. (2022). Potential efficacy of biofilm-forming biosurfactant *Bacillus firmus* hussaint-LAB.66 against rhizoctonia solani and mass spectrometry analysis of its metabolites. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28, 3.
- [37] Arutchelvi, J.I., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M. (2008). Mannosylerythritol lipids: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1559-1570.
- [38] Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M.P., Cocotl-Yañez, M. (2020). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: From molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14 (1), 136-146.
- [39] Rodrigues, L.R., Van der Mei, H.C., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prosthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4408-4410.
- [40] Rodrigues, L.R., Banat, I.M., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potencial applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- [41] Arciola, C.R., Campoccia, D., Montanaro, L. (2002). Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2(5), 478-484.
- [42] Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati M., Donati, E., Montanaro, L. (2002b). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus, *Biomaterials*, 23(21), 4233-4239.
- [43] Heinemann, C., Van Hylckama, V., Janssen, D., Busscher, H.J., Van der Mei, H.C. and Reid, G. (2000) Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), 177-180.
- [44] Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-9.
- [45] Al-Qadisy, I., Saeed, W.S., Al-Odayni, A., Al-Faqeeh, L.A.S., Alghamdi, A.A., Farooqui M. (2020). Novel metformin-based schiff bases: Synthesis, characterization, and antibacterial evaluation. *Materials*, 13(3), 514.
- [46] Öztürk, H. (2009). *Jurinea consanguinea* 'nın antioksidan ve antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Edirne, 32.
- [47] Bakır, E.P., Ünal, S., Bakır, Ş. (2022). Kavite dezenfektanları ile antibakteriyel içerikli adeziv ajanların kombine kullanımının antibakteriyel etkisi. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi*, 27,1.
- [48] Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2015). Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *RSC Advances*, 5, 90960-90968.
- [49] Giani, A.D., Zampolli, J., Di Gennaro, P. (2021). Recent trends on biosurfactants with antimicrobial activity produced by bacteria associated with human health: Different perspectives on their properties, challenges, and potential applications. *Frontier in Microbiology*, 12, 655150.
- [50] Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Van der Mei, H.C. and Oliveira, R. (2006c). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 79-86.
- [51] Van Hoogmoed, C.G., Van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (2004). The influence of biosurfactants released by *S. mitis* BMS on the adhesion of pioneer strains and cariogenic bacteria. *Biofouling*, 20(6), 261-267.
- [52] Ceresa, C., Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Cavallo, M., Rinaldi, M. and Fracchia, L. (2015) Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1116-1125.
- [53] Ciandrini, E., Campana, R., Casettari, L., Perinelli, D.R., Fagioli, L., Manti, A., Palmieri, G.F., Papa, S. et al. (2016). Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against oral streptococci biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6767-6777.
- [54] Gomez, N.C., Ramiro, J.M., Quecan, B.X. and de Melo Franco, B.D. (2016) Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontier in Microbiology*, 7, 863.
- [55] Falagas, M.E., Makris, G.C. (2009). Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: A hypothesis. *Journal of Hospital Infection*, 71(4), 301-306.
- [56] Abdalsadiq, N., Hassan, Z., Lani, M. (2018). Characterization of the physicochemical properties of the biosurfactant produced by *L. acidophilus* and *L. pentosus*. *EPH-International Journal of Science and Engineering*. 4(7), 1-17.
- [57] Madhu, A.N., Prapulla, S.G. (2014). Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 1777-1789.

- [58] Morais, I.M.C., Cordeiro, A.L., Teixeira, G.S., Domingues, V.S., Nardi, R.M.D., Monteiro, A.S., et al. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. *Microbial Cell Factories*, 16, 155.
- [59] Rashid, Z., Farzana, K., Sattar, A., Murtaza, G. (2012). Prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital personnel and associated risk factors. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(5), 985-991.
- [60] Çelik, İ., Cihangiroğlu, M., Çabalak, M., Sevim, E., Akbulut, A., Kılıç, S.S. (2005). Hastane kaynaklı koagülaz negatif stafilokoklarda fosfomisin duyarlılığı ile metisilin direnci ve slaym yapımı ilişkisi, *ANKEM Dergisi*, 19(3), 139-143.
- [61] Yıldırım, N., Sezen, İ.Y., Ardıç, N., İleri, Ç. (2008). Farklı klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilokokların slime faktör üretimlerinin ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 22(4), 209-214.
- [62] Votava, M., Woznicova, V. (2000). Production of slime by staphylococcal isolates from blood cultures. *Central European Journal of Public Health*, 8(1), 18-20.
- [63] Catalanotti, P., Lanza, M., Del Prete, A., Lucido, M., Catania, M.R., Galle, F., Boggia, D., Perfetto, B., Rossano, F. (2005). Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiologica*, 28(4), 345-354.
- [64] Us, E., Tekeli, A., Dolapçı, İ., Karahan, Z.C., Sancak, B., Haşçelik, G. (2009). Çeşitli klinik enfeksiyonlardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında insersiyon sekansı IS256'nın biofilm oluşumu üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 62(2), 53-57.
- [65] Öcal, D.N., Dolapçı, İ., Karahan, Z.C., Tekeli, A. (2017). Stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 51(1), 10-19.
- [66] Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2888-96.
- [67] Rohde, H., Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., Mack, D. (2001). Correlation of *Staphylococcus aureus* icaABCD genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4595-4596.
- [68] Şahin, R., Kaleli, İ. (2018). *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 52(2), 111-122.
- [69] Das, P., Mukherjee, S., Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1675-84.
- [70] Satpute, S.K., Bhuyan, S.S., Pardesi, K.R., Mujumdar, S.S., Dhakephalkar, P.K., Shete, A.M., Chopade, B.A. (2010) Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 14-41.
- [71] Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., Martinotti, M.G. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2, 827-837.
- [72] Xu, C., Yagiz, Y., Hsu, W.Y., Simonne, A., Lu, J., Marshall, M.R. (2014). Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected foodborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(28), 6640-6649.
- [73] Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 419-424.
- [74] Velraeds, M.M., Van de Belt-Gritter, B., van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.J. (1998). Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *Journal of Medical Microbiology*, 47(12), 1081-1085.
- [75] Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z. and Hasnain, S.E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 481-489.
- [76] Fracchia, L., Banat, J.J., Cavallo, M., Ceresa, C., Banat, I.M. (2015). Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *AIMS Bioengineering*, 2, 144-162.
- [77] Díaz de Rienzo, M., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I.M. (2016b). *P. aeruginosa* biofilm disruption using microbial biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 868-876.
- [78] Chen, J., Wu, Q., Hua, Y., Chen, J., Zhang, H. and Wang, H. (2017). Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101, 8309-8319.
- [79] Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., Yousefi, G. Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization. *Scientific Reports*, 9, 5287.
- [80] Efe, F. (2017). *Lactobacillus cinsi bakterilerde biyosümfektan üretimi ve biyosümfektanın Staphylococcus aureus bakterilerinin oluşturduğu biyofilmi engellemesi*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 67-77.